

Capitolo I

Introduzione

1. Inquadramento tassonomico del genere *Pseudomonas*

Il genere *Pseudomonas* (dal greco *pseudo*= variabile e *monas*= forma) comprende un gran numero di batteri ecologicamente ed economicamente significativi. Procarioti afferenti a tale genere sono stati rinvenuti in tutti i principali ecosistemi, terrestri, marino e lacustre, e non mancano pseudomonadi che stabiliscono rapporti di varia natura con piante e animali. La rilevanza e la complessità di questo genere hanno fatto sì che esso più volte fosse sottoposto ad un profondo riesame dal punto di vista tassonomico.

Il padre della classificazione batterica, Ferdinand Cohn, nel 1872, propose uno schema di catalogazione naturale, basato sull'osservazione dei caratteri morfologici delle cellule batteriche. Cohn, sulla scia di quanto fatto da Linneo per gli organismi superiori, distribuì i batteri in gruppi i cui membri condividessero gli stessi attributi fenotipici: forma e dimensione delle cellule, colore e morfologia della colonia, presenza di ciglia e flagelli e loro posizionamento, comportamento nella colorazione, inclusioni cellulari e così via. Questo sistema, seguito da molti tassonomi negli anni seguenti, non teneva in considerazione le relazioni evolutive tra i diversi organismi.

Per cercare di colmare questa lacuna, nel 1909, Orla-Jensen, propose un modello di classificazione basato sulle proprietà fisiologiche dei batteri. La formidabile diversità metabolica dei procarioti, evidenziata successivamente in maniera più completa dagli studi di Beijerinck (1921) e da Winogradsky (1949), è stata di enorme utilità nella tassonomia batterica, in quanto direttamente correlata alla natura ed all'attività degli enzimi microbici ed alle proteine di trasporto. Dato che le proteine sono dei prodotti genici, l'analisi di tali caratteristiche fornisce un confronto indiretto dei genomi batterici. Queste implicazioni evolucionistiche suggerivano che la morfologia e la fisiologia dei batteri si fossero sviluppate indipendentemente. L'utilizzazione dell'uno o dell'altro criterio, infatti, portava alla costituzione di gruppi completamente differenti. La classificazione di Orla-Jensen prendeva in

considerazione molti parametri tra cui i costituenti della parete cellulare, le sorgenti di azoto e carbonio utilizzate, il tipo di nutrizione, l'eventuale presenza di prodotti della fermentazione, il tipo di fonte energetica utilizzato, i cardinali termici di crescita, i meccanismi di conversione dell'energia, i rapporti con l'ossigeno, la tolleranza osmotica e così via. Tale sistema riteneva di scarsa importanza una serie di caratteristiche ecologiche tra cui la più significativa, dal punto di vista agrario, è senza dubbio la patogenicità sia nei confronti degli animali sia nei confronti dei vegetali.

Al contrario Bergey, nel 1923, con la pubblicazione della prima edizione del "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", tenne conto non solo delle proprietà morfologiche e fisiologiche dei batteri, ma anche di quelle patogenetiche, opportunistiche e competitive. Dopo i primi scetticismi, anche i microbiologi europei accettarono i nuovi criteri tassonomici proposti da Bergey e collaborarono con questo ultimo per rendere sempre più accurato il suo sistema di classificazione.

Nonostante gli innumerevoli sforzi però, la sistematica batterica viveva una situazione di sostanziale insoddisfazione, che rimase invariata fino al 1960, quando Stanier propose una riesamina dell'importante genere *Pseudomonas*, definito per la prima volta da Migula nel 1894. Questo lavoro, esteso poi a vari gruppi batterici, consistette nel sottoporre diversi ceppi a svariati saggi fenotipici per determinare un profilo nutrizionale, come già proposto nel 1926 da Den Dooren de Jong. La collezione analizzata fu suddivisa in un certo numero di specie e di gruppi di specie in funzione della capacità di crescita su determinati substrati. Il completamento dello studio di questo taxon fu ottenuto solo nell'arco di alcuni anni (1966/1973) e con l'ausilio di un elevato numero di tassonomi (Redfearn, Ballard, Palleroni, Doudoroff, Ralston, Barret, Champion, Jonshon, Sands e molti altri) (Palleroni, 2003).

L'approccio che ha però avuto maggiore impatto nell'ambito della classificazione degli pseudomonadi, è sicuramente quello basato sullo studio degli acidi nucleici. Tecniche molecolari, quali l'ibridazione DNA-DNA, sono state applicate seguendo la metodologia, messa a punto da Jonshon & Ordal nel 1968. Questo tipo di ibridazione prevede l'utilizzo di filtri di nitrocellulosa a cui sono legati singoli filamenti di DNA dei ceppi da saggiare. Tali filtri sono incubati con altri frammenti di DNA a singolo filamento marcati con isotopi radioattivi. Dopo aver lavato la membrana, per allontanare i ss-DNA non ibridati, si procede alla misurazione della radioattività. La quantità di radioattività legata al filtro è indice

dell'entità di ibridazione e, quindi, di similarità delle sequenze dei due tipi di DNA. Il grado di omologia nella sequenza delle basi è espressa in termini di percentuale di radioattività (Prescott, 2000). L'ibridazione DNA-DNA ha permesso, in termini generali, di confermare la classificazione fenotipica degli pseudomonadi, ma, allo stesso tempo, ha portato a concludere che esiste un'elevatissima eterogeneità genomica all'interno del taxon. Basti pensare che le dimensioni del genoma possono spaziare da 3.7 Mbp nel caso di *Pseudomonas stutzeri* fino a 7.1 Mbp nel caso di *Pseudomonas aeruginosa* (Spiers *et al.*, 2000). Per tale motivo le successive indagini sono state indirizzate verso lo studio di regioni conservate del genoma. Il lavoro nei laboratori di Doi & Igarashi (1965) e Doubnau (1965) ha dimostrato che i geni codificanti per l'RNA ribosomiale e, nel caso specifico della regione 16S, rappresentano solo una minima parte dell'intero DNA e non si sono evoluti con la stessa rapidità degli altri geni microbici. La misurazione del grado di omologia all'interno di tali regioni conservate risulta essere più attendibile che non su tutto il genoma per cui è stata apportata una modifica alla tecnica usata, passando da ibridazioni DNA-DNA a ibridazioni DNA-rRNA.

L'utilizzo di questa metodica, da parte di Palleroni *et al.*, con la pubblicazione nel 1973 della VII edizione del "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", ha finalmente condotto alla divisione del genere *Pseudomonas* in 5 gruppi abbastanza distanti tra loro. In questo modo è stato possibile verificare come batteri appartenenti a diversi generi, quali *Xanthomonas* o *Escherichia*, risultano essere filogeneticamente più vicini ad alcuni pseudomonadali di quanto non lo siano membri appartenenti ad altri gruppi dello stesso taxon. I cinque gruppi di omologia dell'RNA possono, allo stato attuale degli studi, essere considerati come cinque differenti entità tassonomiche indipendenti l'una dall'altra. L'attuale definizione del genere oggi in uso è infatti la seguente "Il genere *Pseudomonas* è un'entità multigenerica che può essere suddivisa in cinque gruppi di specie abbastanza distanti, di cui soltanto uno può propriamente essere chiamato *Pseudomonas*". Il gruppo I comprende infatti quelle che sono poi state rinominate *Pseudomonas* "sensu stricto" (Palleroni, 2003). Il seguente schema può essere esplicativo della complessa situazione tassonomica del genere:

- ✿ REGNO: *Procaryotae*
- ✿ DIVISIONE: *Gracilicutes*

- ✿ CLASSE: γ -Proteobacteria
- ✿ FAMIGLIA: Pseudomonadaceae
- ✿ GENERE: *Pseudomonas*

La situazione intragenerica è la seguente (Fig1.1):

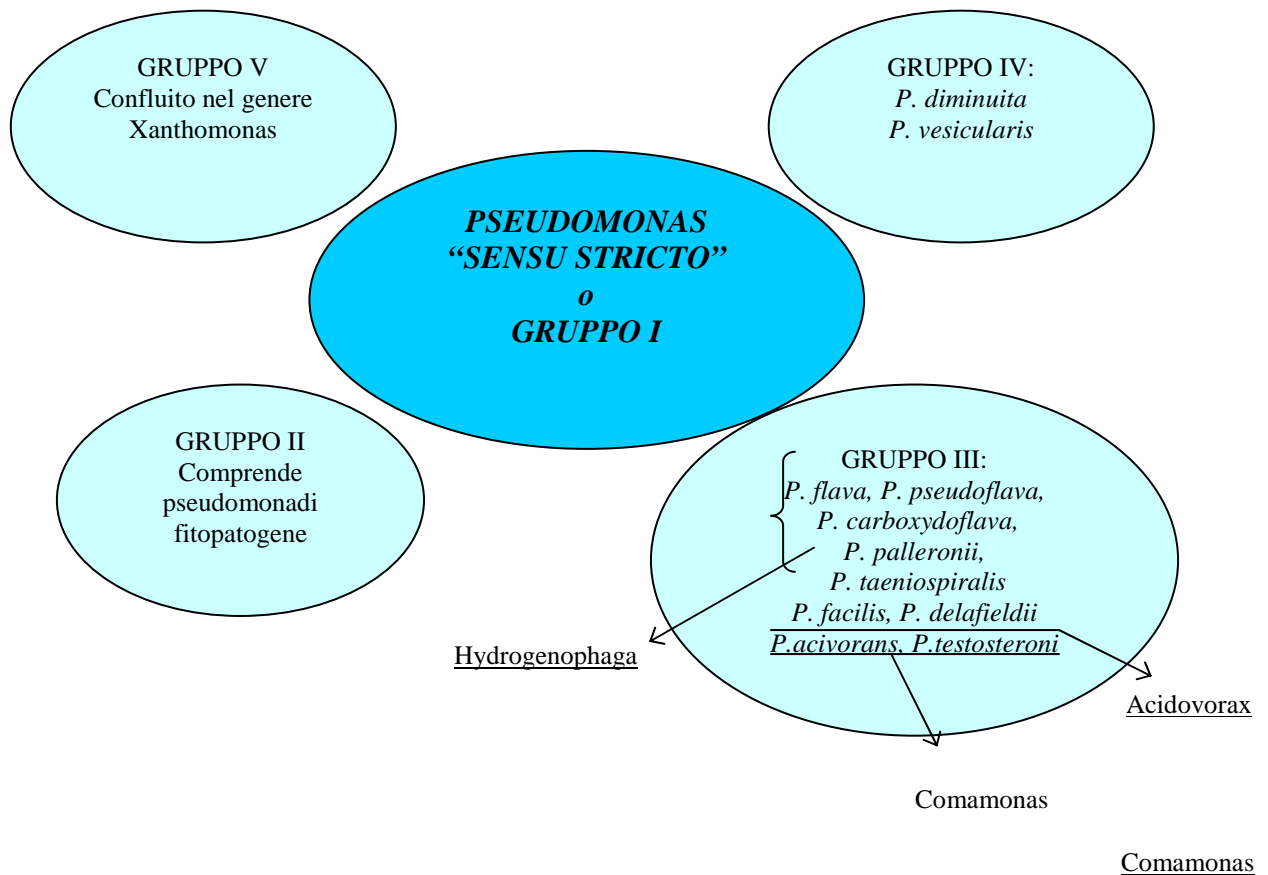


Fig. 1.1 : Suddivisione delle diverse specie di *Pseudomonas* nei cinque gruppi di omologia dell'RNA. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 1995.

Il gruppo IV e V appaiono nettamente distanziati dagli altri tre; i membri appartenenti al gruppo III sono stati ridistribuiti in tre generi differenti ossia *Comamonas*, *Acidovorax* e *Hydrogenophaga*, rispettivamente nel 1987, 1989 e 1990. L'allocatione di diverse entità in altri generi ha permesso di circoscrivere con ancora maggiore chiarezza il gruppo delle *Pseudomonas* "sensu stricto".

2. *Pseudomonas* “sensu stricto”

Il gruppo di omologia dell'r-RNA I, ossia gli *Pseudomonas* “sensu stricto”, comprende batteri bastoncellari, dritti o lievemente ricurvi, di $0.5-1.0 \times 1.5-5.0 \mu\text{m}$ di lunghezza, mobili per la presenza di uno o più flagelli polari e privi di rivestimenti esterni. Si tratta di batteri Gram negativi, non sporigeni e dotati di metabolismo chemioeterotrofo strettamente aerobio, in cui l'ossigeno molecolare funge da accettore finale di elettroni. In genere essi sono ossidasi positivi. Sono organismi mesofili ed hanno una temperatura ottimale di crescita compresa tra i 25°C e i 35°C . Non tollerano temperature molto elevate, mentre possono sopravvivere anche al di sotto degli 0°C . Gli *Pseudomonas* “sensu stricto” sono distinti dagli altri 4 raggruppamenti del genere in base al fatto che non accumulano come riserva di carbonio il PBH (Poli- β -idrossibutirrato). Ulteriore distinzione all'interno del gruppo stesso è attuata in funzione della produzione di pigmenti fluorescenti, della patogenicità, della produzione di arginina deidrolasi e dell'utilizzazione di glucosio. Il gruppo degli pseudomonadi fluorescenti comprende specie di una certa rilevanza e molto interessanti viste le loro peculiari caratteristiche (Tab. 1.1)

- **Ceppi produttori di pigmenti fluorescenti**

1. *Presenza di arginina deidrolasi. Batteri saprofiti o patogeni animali:*

P. aeruginosa

P. fluorescens

P. chlororaphis

P. aureofaciens

P. putida

- **Ceppi non produttori di pigmenti fluorescenti**

1. *Idrolizzano il glucosio:*

P. stutzeri

P. mendocina

2. *Non idrolizzano il glucosio:*

P. alcaligenes

P. pseudoalcaligenes

Tabella 1.1: Criteri utilizzati per la suddivisione delle specie di *Pseudomonas* all'interno del gruppo I. Modificato da “Bergey's Manual of Determinative Bacteriology”, 1995.

Il primo rappresentante di questa sezione è un importante patogeno umano delle vie respiratorie, scoperto nel 1872 da Schroeter, *Pseudomonas aeruginosa*. Esso è il primo pseudomonade fluorescente descritto e vista la sua significatività clinica è stato studiato approfonditamente. Occasionalmente risulta essere anche fitopatogeno. Sui substrati di isolamento più comunemente utilizzati, le colonie di questo batterio si presentano piccole, appiattite, compatte e di colore blu intenso.

Più complessa è invece la specie *Pseudomonas fluorescens*, scoperta da Trevisan nel 1889. Questo batterio è stato ritrovato sia nel suolo sia nell'acqua, oltre che associato a vari alimenti frigoconservati quali latte, carne, uova. La specie è stata suddivisa in 5 diverse biovar:

- ❖ Biovar I (biotipo A): Comprende tutti i batteri che hanno le caratteristiche della *P. fluorescens* tipica.

- ❖ Biovar II: Include organismi saprofiti e ceppi di *P. marginalis* (Brown, 1918)

- ❖ Biovar III (biotipo C): Comprende pseudomonadi fluorescenti in grado di degradare acidi carbossilici.

- ❖ Biovar IV (biotipo F): Include ceppi di *P. lemonnieri* (Lousser, 1913).

- ❖ Biovar V (biotipo G): E' un gruppo di batteri molto eterogenei dal punto di vista delle proprietà nutrizionali e che hanno perso una o più caratteristiche ritenute di fondamentale importanza per l'attribuzione ad una delle precedenti biovar.

Quando allevate in piastra questi pseudomonadi formano colonie piccole, piatte, compatte e di colore giallo intenso.

Le specie *Pseudomonas chlororaphis* (Guignard e Sauvangeau, 1894) e *Pseudomonas aureofaciens* (Kluyver, 1956) sono distinte in base a delle minime differenze metaboliche e per alcuni autori le due diverse denominazioni sono sinonimi. In realtà i due batteri se allevati sui più comuni substrati di crescita formano colonie del tutto identiche, piccole, piatte, compatte di colore arancione intenso.

L'ultimo rappresentante del raggruppamento è *Pseudomonas putida* (Trevisan, 1889). Anche questa specie è divisa in 2 diverse biovar, A e B, in funzione di differenti caratteri fenotipici. *In vitro* esso forma colonie piccole, piatte, compatte e di colore lievemente paglierino. L'identificazione di diverse specie e biovar di pseudomonadi fluorescenti è attualmente effettuata con l'ausilio di metodi biochimici

commercializzati come kits completi e immediatamente utilizzabili, che si basano sui risultati dei “test classici” riportati nel “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” e che sono elencati nella tabella 1.2.

3. Pseudomonadi fluorescenti nel controllo biologico

Gli pseudomonadi, che colonizzano la rizosfera di molte piante coltivate, sono dei potenziali farmaci biologici in quanto capaci di proteggere le colture dall’attacco di microrganismi patogeni e quindi di aumentarne le loro rese produttive. Il rischio per l’ambiente e le ripercussioni sulla salute umana di un irrazionale utilizzo dei fitofarmaci in agricoltura, rendono sempre più auspicabile l’avvento di tecniche colturali ecocompatibili, che limitino l’impiego dei pesticidi di sintesi .

Esistono, sebbene siano molto rari, dei suoli naturalmente soppressivi nei confronti di vari patogeni. Lo studio approfondito di tali habitat ha permesso di comprendere che questa loro caratteristica è attribuibile alla biodiversità in essi presente; in particolar modo esistono delle popolazioni microbiche che, attraverso vari meccanismi, riescono a contenere lo sviluppo epidemico dei patogeni (Pierson e Pierson, 1996). Gli pseudomonadi fluorescenti sono particolarmente adatti per essere utilizzati come agenti di controllo biologico (BCA) poiché:

- Sono molto abbondanti nei suoli naturali, in particolare nella rizosfera di piante coltivate. Ciò è indice della grande capacità di adattamento di questo gruppo di batteri (Sands e Rovira, 1971). Hanno una velocità di crescita superiore rispetto agli altri microrganismi terricoli.
- Possono avvalersi di diversi meccanismi per inibire i fitopatogeni e proteggere le colture. In particolare gli pseudomonadi hanno la capacità di sintetizzare diversi metaboliti ad attività antagonistica.
- E’ facile allevarli *in vitro*.
- Possono essere introdotti nella rizosfera mediante batterizzazione dei semi (Rhodes e Powell, 1994).
- Sono facilmente manipolabili geneticamente.
- Alcuni ceppi di pseudomonadi fluorescenti non patogeni sono in grado di indurre la Resistenza Sistemica Indotta (ISR), allertando le piante contro attacchi di eventuali patogeni (Pieterse *et al*, 2001)

Caratteristiche	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. chlororaphis</i>	<i>P. aureofaciens</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. mendocina</i>	<i>P. alcaligenes</i>	<i>P. pseudoalcaligenes</i>
N° flagelli	1	>1	>1	>1	>1	1b	1b	1	1
Fluorescenza	D	+	+	+	+	-	-	-	-
Piocianine	D	-	-	-	-	-	-	-	-
Carotenoidi	-	-	-	-	-	-	-	D	-
Crescita a 41°C	+	-	-	-	-	D	+	+	+
Produzione di levano	-	D	-	-	-	-	-	-	-
Arginina deidrolasi	+	+	+	+	+	-	+	+	D
Ossidasi	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Denitrificazione	+	D	D	D	-	+	+	+	D
Idrolisi della gelatina	+	+	+	+	-	-	-	D	D
Idrolisi dell'amido	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Utilizzazione glucosio	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Utilizzazione trealosio	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Utilizzazione 2-chetogluconato	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Utilizzazione meso-inositolo	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Utilizzazione geraniolo	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Utilizzazione L-valina	D	+	+	+	+	+	+	-	-
Utilizzazione β-alanina	+	+	+	+	+	-	+	D	D
Utilizzazione L-arginina	+	+	+	+	+	-	+	+	+

**Tab. 1.2: Saggi differenziali per il gruppo degli pseudomonadi fluorescenti “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology”, 1995.D=comportamento variabile; +=reazione positiva, -=reazione negativa
b= in particolari situazioni può presentare flagelli laterali**

Esiste un ceppo di *P. chlororaphis*, commercializzato come prodotto di biocontrollo, con il nome di Cedomon (Bioagri AB, Uppsala, Sweden), utilizzato per il trattamento dei semi di avena ed orzo. E' molto interessante il fatto che siano i semi ad essere batterizzati in quanto questo permette di aumentare il numero di piante che possono essere protette e incrementare lo spettro delle malattie potenzialmente controllate. Varie sono le caratteristiche che permettono agli pseudomonadi fluorescenti di colonizzare la rizosfera in maniera più efficace dei microrganismi fitopatogeni: velocità di crescita, tolleranza osmotica, resistenza ai predatori e motilità dei batteri sono solo alcuni esempi. Grande interesse ha però suscitato, negli ultimi anni, lo studio dei meccanismi biogenetici e di regolazione dei metaboliti secondari implicati nell'attività di biocontrollo. L'attenzione è stata in particolare concentrata su alcuni gruppi di molecole quali i siderofori, enzimi litici (chitinasi) e gli antibiotici (fenazine).

4. I siderofori

Il ferro svolge un ruolo chiave nel normale metabolismo batterico e nelle interazioni tra microrganismi ed organismi superiori. Esso è un importante costituente della struttura di enzimi cruciali nel processo di trasporto degli elettroni e nella sintesi dell'RNA. Il ferro è presente nell'ambiente in quantità molto elevate, ma è scarsamente disponibile a causa della presenza di ossigeno e di condizioni di pH neutro, comuni nel suolo. La rapida ossidazione da ferro ferroso (Fe^{2+}) a ferro ferrico (Fe^{3+}) e la successiva formazione di ossidi insolubili, rendono complicato per i microrganismi e le piante l'assunzione di tale elemento. Per sopperire a questa situazione di carenza, i batteri hanno acquisito la capacità di sintetizzare e secernere i siderofori (Neilands, 1995), pigmenti idrosolubili a basso peso molecolare, che riescono a legare in maniera specifica il ferro trivalente (Faraldo-Gómez e Sanson, 2003). Spesso alla produzione di efficienti siderofori da parte del ceppo si accompagna la capacità di riuscire ad utilizzare il ferro chelato da altri microrganismi a proprio vantaggio. Gli *Pseudomonas* "sensu stricto" producono siderofori che emettono fluorescenza giallo-verde, visibili in maniera netta esponendo le colonie batteriche ai raggi U.V. Tali composti inibiscono lo sviluppo di alcuni microrganismi patogeni presenti nella rizosfera, grazie alla loro capacità di sottrarre selettivamente

al loro sviluppo un nutriente essenziale come il ferro. I siderofori sono costituiti da un cromoforo, che determina la fluorescenza della molecola e da una catena peptidica formata da un numero di aminoacidi variabile da 6 a 12 (Cornelis e Matthijs, 2002). La grande variabilità del peptide legato al cromoforo e la sua composizione aminoacidica sono gli elementi che permettono di mettere in relazione queste molecole con il ceppo che le ha prodotte. Ad esempio *Pseudomonas aeruginosa* secerne prevalentemente pioverdine o piochelatine, mentre *Pseudomonas fluorescens* produce pseudomonine o quinolobactine e così via (Fig. 1.2).

La controversa questione della classificazione del raggruppamento degli pseudomonadi fluorescenti potrebbe essere risolta con un innovativo approccio basato sul tipo e il numero di siderofori prodotti da ogni singola specie. Molte specie sono state reintegrate nel gruppo I di omologia dell'RNA degli *Pseudomonas* in seguito all'utilizzo di questa metodica, che resta in ogni modo ancora del tutto marginale e in via di sperimentazione (Meyer *et al*, 2002). Studi biochimici, fisiologici, genetici e biologico-molecolari hanno permesso di determinare le complesse vie biosintetiche che portano alla genesi e alla traslocazione di alcuni siderofori prodotti dagli pseudomonadi fluorescenti. La sintesi di tali molecole è finemente controllata da una cascata di regolatori trascrizionali positivi e negativi, che assicurano l'espressione dei geni per la cattura del ferro in relazione alle esigenze nutrizionali del microrganismo. Il trasporto dei siderofori all'interno della cellula batterica invece è mediata dal complesso dei trasportatori ABC. Essi si avvalgono dell'energia fornita dall'idrolisi dell'ATP per attuare un meccanismo di trasporto attivo mediato da proteine con alta affinità nei confronti dei siderofori (Faraldo-Gómez e Sansom, 2003). Probabilmente anche il trasporto di altri microelementi, come il cobalto e il molibdeno, è mediato da queste molecole fluorescenti (Visca *et al*, 1992).

Nonostante esista una disputa sul ruolo assunto dai siderofori nel biocontrollo di organismi fitopatogeni, è indubbio che essi siano coinvolti in tali meccanismi. Probabilmente la grande variabilità della struttura di tali metaboliti rispecchia i differenti effetti biologici che essi possono determinare sia come agenti chelanti il ferro sia come peptidi antibiotici (Cornelis e Matthijs, 2002).

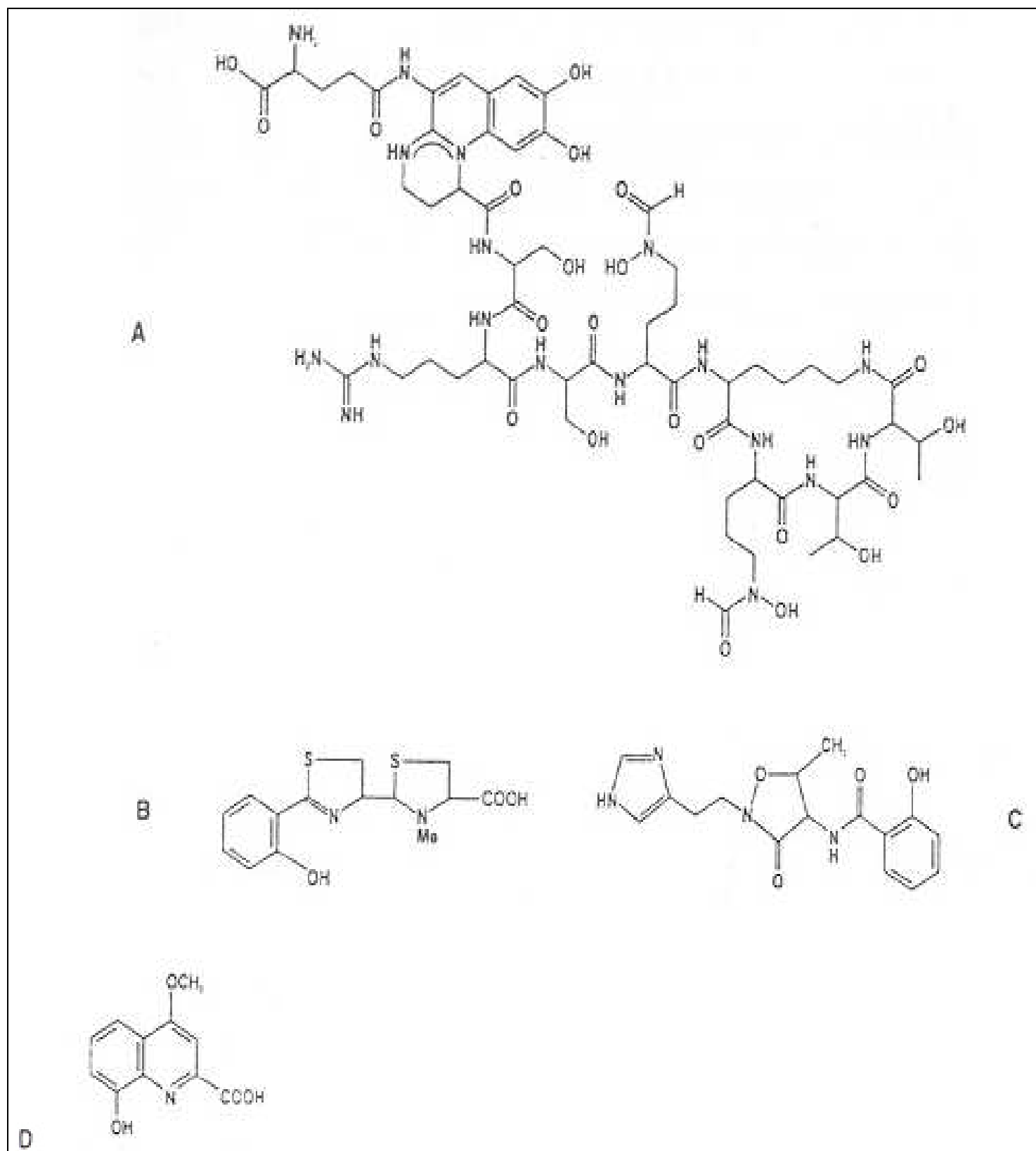


Fig. 1.2: Struttura di differenti siderofori prodotti da pseudomonadi fluorescenti.

A= piobactine

B= pioverdine

C= pseudomonine

D=quinolobactine

5. Chitinasi

La produzione, da parte di alcuni ceppi di pseudomonadi fluorescenti, di enzimi capaci di degradare la parete cellulare dei funghi è uno dei meccanismi implicati nel controllo biologico di organismi fitopatogeni. Il contemporaneo processo di mineralizzazione di una così abbondante fonte di carbonio e azoto non è certamente, poi, di secondaria importanza.

Varie sono le tipologie di chitinasi batteriche; esse sono state collocate in 18 differenti famiglie secondo la somiglianza della sequenza amminoacidica e dei loro meccanismi di azione. Queste 18 famiglie a loro volta sono state suddivise nei gruppi A, B e C in funzione delle reazioni cataboliche catalizzate. Il gruppo A è quello meglio conosciuto e che ha permesso di fornire maggiori informazioni riguardo la diversità e la variabilità di questo enzima batterico (Metcalf *et al*, 2002). La chitina è un omopolimero di β -1,4-acetil-glucosammina, che conferisce flessibilità e resistenza alla struttura delle ife fungine. I batteri, se allevati su mezzi particolarmente ricchi non sintetizzano tale enzima, mentre integrano la loro nutrizione su substrati minimali degradando la chitina. Lo pseudomonade più studiato a tal proposito è *P. aeruginosa*. Tale chitinasi per poter esplicare la sua attività deve essere secreto nell'ambiente extracellulare. Il gene *chiC* codifica per un peptide di 483 amminoacidi che mostra molte analogie con le chitinasi ChiC di *Serratia marcescens*, ChiA di *Vibrio harveyi* e con ChiD di *Bacillus circulans*.

La particolarità di tale polipeptide è la mancanza dell'estremità N-terminale che, negli altri ceppi batterici, ha la funzione di permettere il trasporto dell'enzima all'esterno della cellula in cui è stato sintetizzato. Probabilmente questo significa che la proteina utilizza una via metabolica nuova e, per ora, ancora sconosciuta.

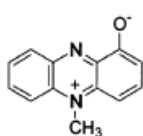
L'espressione del gene è regolata da un sistema *quorum sensing*. Gli studi di Folders *et al*, 2001 hanno dimostrato che dopo una notte in coltura la maggioranza delle chitinasi prodotte erano intracellulari per cui soltanto una piccolissima aliquota era stata ritrovata nel mezzo di coltura. Al contrario dopo alcuni giorni una parte consistente di tali enzimi è stata ritrovata nel substrato. Questo potrebbe essere collegato, come nel caso della produzione di fenazine, alla densità della popolazione batterica (Folders *et al*, 2001).

6. Antibiotici

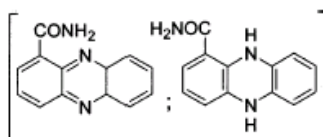
I metaboliti secondari che più degli altri sono implicati nell'azione di contenimento di patogeni terricoli, sono gli antibiotici. La pioluteorina e la pirrolnitrina controllano i marciumi delle piantine in post-emergenza causati da *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* (Homma et al, 1989). Il 2,4-diacetilfluoroglucinolo è coinvolto nel controllo del marciume nero delle radici del tabacco dovuto a *Thielaviopsis basicola* e del mal del piede dei cereali il cui agente è *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Keel et al, 1990). La fenazina-1-acido carbossilico è attiva nella soppressione della septoriosi del grano causato da *Septoria tritici* (Flaishmann et al, 1990).

La famiglia di antibiotici più comunemente sintetizzati dagli pseudomonadi fluorescenti sono le fenazine:

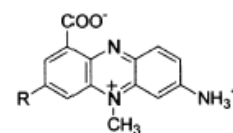
- piocianine
- fenazina-1-acido carbossilico (PCA)
- fenazina-1-carbossiamide o clororafina (PCN)
- 2-idrossifenazina-1-acido carbossilico (2-OH-PCA)
- 2-idrossifenazina (2-OH-PZ)



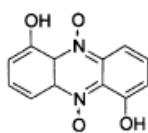
Piocianina



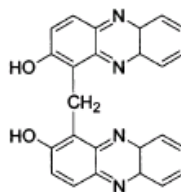
Clororafina



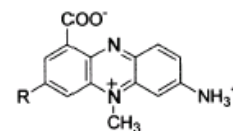
Aeruginosina A (R=H)



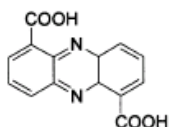
Iodinina



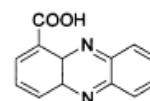
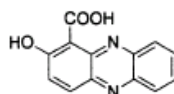
2-idrossifenazina-1-acido carbossilico



Aeruginosina B (R=HSO₃)



Fenazina-1,6-acido dicarbossilico



Fenazina-1-acido carbossilico

Fig. 1.3 Esempi di fenazine prodotte da specie afferenti al genere *Pseudomonas*.

Queste molecole sono composti eterociclici contenenti azoto (Fig. 1.3) e sono prodotti quasi esclusivamente dai batteri. PCA e PCN sono prodotti prevalentemente da *P. fluorescens* 2-79 (Thomashow e Weller, 1988), *P. aureofaciens* 30-84 (Pierson *et al*, 1995) e *P. chlororaphis* PCL 1391 (Ching-A-Woeng *et al*, 1998).

Le fenazine sono coinvolte in molti meccanismi di virulenza, competizione e controllo biologico. Per *P. aeruginosa* queste molecole sono importanti fattori di virulenza, fondamentali durante le invasioni polmonari degli ospiti animali, mentre *P. fluorescens* e *P. aureofaciens* producono questi stessi metaboliti per colonizzare con maggiore efficacia la rizosfera (Pierson III *et al*, 1995).

Le fenazine sono soprattutto prodotte da cellule che si ritrovano nello stadio stazionario di crescita ed è stato assunto che la produzione possa proteggere il microrganismo produttore contro altri microrganismi competitori. La modalità con cui le fenazine esplicano la propria attività antibiotica è tuttora incerta e sono state formulate più ipotesi.

Il nucleo centrale delle fenazine presenta similarità con diverse sostanze intercalanti quali le attinomicine, le cromomicine, le daunomicine ed il più famoso bromuro di etidio. Alla luce della sua conformazione sono stati effettuati degli studi riguardanti l'interazione di composti fenazinici con acidi deossi e ribonucleici. Nel 1971 Hollstein *et al*. hanno riportato uno studio riguardo l'interazione di piocianine e iodina con vari polinucleotidi, dimostrando, mediante l'analisi dell'assorbanza, che le fenazine hanno la capacità di legarsi a struttura a doppio filamento sia di DNA che di RNA, rivelando una costante di associazione comparabile con le costanti del bromuro di etidio e delle attinomicine.

Una seconda ipotesi deriva dalla capacità di alcuni derivati carboxamidici delle fenazine nell'inibire l'attività dell'enzima topoisomerasi II; (Atwell *et al*., 1987), ma finora tale attività inibitoria non è stata riscontrata in alcuna delle fenazine prodotte in natura.

L'attività antibiotica delle fenazine può essere ipotizzata come legata alla produzione di radicali liberi. La piocianina, prodotta da *P. aeruginosa*, è in grado di accettare un elettrone e formare un anione radicale stabile il quale, è stato ipotizzato che sia responsabile dell'incremento dell'anione superossido (O_2^-) e del perossido di idrogeno (H_2O_2). Alla luce di tali dati è stato ipotizzato che la sovrapproduzione di

forme reattive dell'ossigeno associata al malfunzionamento della superossido dismutasi cellulare, comporti l'accumulo di un livello di radicali liberi tale da causare la morte cellulare (Hassan *et al.*, 1980; Turner *et al.*, 1986; Kerr 2000; Delaney *et al.*, 2001). L'ipotesi enunciata pocanzi è stata confutata dai dati di Baron *et al.* (1989) che hanno dimostrato la mancanza di correlazione tra i livelli di attività della superossido dismutasi e la resistenza alla piocianina.

É stato inoltre suggerito che l'anione della piocianina possa sottrarre ioni Mg^{2+} e, così complessata, possa passare attraverso le membrane cellulari dove nella sua forma zwitterionica è in grado di interrompere il trasporto degli elettroni inibendo in tal modo la respirazione cellulare (Baron *et al.*, 1989; Sorensen *et al.*, 1993).

Studi recenti effettuati su batteri metanogeni (Abken *et al.*, 1998) hanno verificato la capacità della 2-idrossifenazina di veicolare gli elettroni all'interno della membrana cellulare di suddetti batteri. Nel ceppo Go1 di *Methanosarcina mazei*, la metanofenazina, un etere alchilico della idrossifenazina, assolve un compito assimilabile al ruolo svolto dall'ubichinone nei mitocondri (Beifuss *et al.* 2000).

7. Produzione di fenazine in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84

Pseudomonas aureofaciens si presenta come un bastoncello di 1.3 μ di lunghezza e 0.7 μ di larghezza con flagelli polari. I bastoncelli possono presentarsi singolarmente o in coppie, è raro osservare la formazione di catene di bastoncelli. Le colonie che si sviluppano a 28°C si presentano con un diametro che oscilla tra i 2 ai 5 mm dopo 3 giorni di incubazione e dai 7 ai 10 mm dopo 7 giorni di incubazione. Il colore di tali colonie è arancione, colorazione dovuta alla produzione di fenazine (Haynes *et al.*, 1956).

Il ceppo 30-84 di *Pseudomonas aureofaciens* è un agente di biocontrollo isolato da rizosfera di piante di grano prelevate da terreno in cui il "mal del piede" causato dall'ascomicete *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* era stato naturalmente soppresso. Tale ceppo riduce la severità del mal del piede mediante la produzione di tre diversi composti fenazinici (Fig. 1.4) quali la fenazina-1-acido carbossilico (PCA), 2-idrossifenazina-1-acido carbossilico (2-OH-PCA) ed infine 2-idrossifenazina (2-OH-PZ) (Pierson *et al.* 1992, Pierson, 1996). Le fenazine contribuiscono anche alla fitness di tale ceppo batterico nella rizosfera, difatti è stato

notato che la perdita della capacità di produzione di tali antibiotici comporta una riduzione di un valore pari a 10^4 nella popolazione batterica su radici di grano in presenza di altri microrganismi (Mazzola *et al.*, 1992).

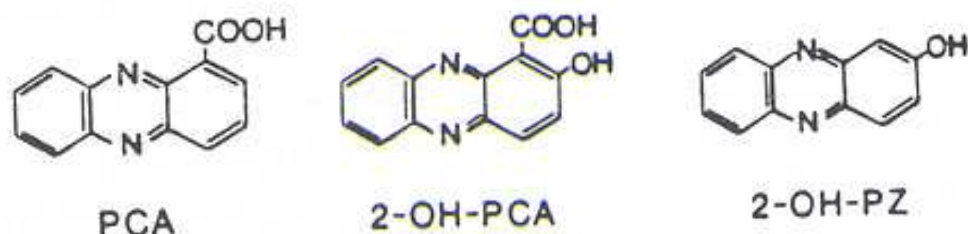


Fig. 1.4 Composti fenazinici prodotti da *P. aureofaciens* 30-84.

Un operone di 7 geni (*phzXYFABCD*) è responsabile della produzione dei tre composti fenazinici (Pierson *et al.*, 1995). Nella figura 1.5 è riportata l'organizzazione dell'operone delle fenazine mentre nella tabella 1.3 sono riportati le informazioni sommarie riguardanti i sette geni.

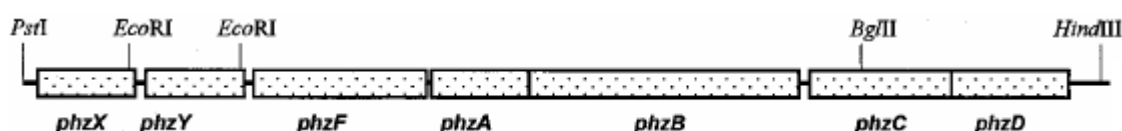


Fig. 1.5 Organizzazione dell'operone delle fenazine

Gene	Lunghezza	%GC	Numero di aa.	Similarità ¹	Identità ²
<i>phzX</i>	492	62	163	?	?
<i>phzY</i>	492	62	163	?	?
<i>phzF</i>	1200	62.9	400	AroF	58.5
<i>phzA</i>	621	65.2	207	EntB	72
<i>phzB</i>	1911	63.2	637	TrpE	53.8
<i>phzC</i>	834	63.8	278	ThyA	50.2
<i>phzD</i>	666	62	222	PdxH	53.4

Tab. 1.3 Descrizione dei geni facente parte dell'operone delle fenazine.

¹= Similarità con altri geni: AroF=*N. tabacum*; EntB=*E. coli*; TrpE=*R. meliloti*; ThyA=*M. tuberculosis*; PdxH=*E. coli*

²= Determinata in base alla similarità della sequenza aminoacidica.

Modificato da Pierson III *et al*, 1995.

Le funzioni dei prodotti dei geni *phzX* e *phzY* non sono state del tutto chiarificate ma è stato ipotizzato che entrambe i prodotti partecipino alla stabilizzazione di un ipotetico complesso multienzimatico (Chang *et al.*, 1990) coinvolto nella produzione delle fenazine generando una maggiore quantità di fenazina-1-acido carbossilico. È stato verificato che il trasferimento in *E. coli* dell'operone delle fenazine mancante di geni omologhi di *phzX* e *phzY* (*phzA* e *phzB* di *P. fluorescens* 2-79) induceva la produzione di composti eterociclici contenenti azoto e solo in minima parte di PCA mentre il trasferimento dei sette geni dell'operone delle fenazine produceva soprattutto il composto PCA (Mavrodi *et al.*, 1998).

Il gene *phzF* codifica per una DAHP sintetasi (3-deossi-D-arabino-eptulosonato-7-fosfato sintetasi), un enzima che si trova a monte della cascata metabolica che permette la produzione di acido scichimico. La proteina PhzF, prodotta da *P. aureofaciens*, è più simile alla DAHP sintetasi prodotta in pianta (*Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Arabidopsis thaliana*) che non a quella prodotta da altri ceppi batterici (Wang *et al.*, 1991). E' stato inoltre dimostrato che la regolazione della DAHP sintetasi è molto più complessa nei batteri produttori di fenazine rispetto a quelli che non le producono. Questo enzima presenta un meccanismo di feedback per cui un eccesso di prodotto genico blocca l'espressione del gene stesso. Dato che l'acido scichimico è un intermedio di molte vie metaboliche, il ruolo del gene *phzF* potrebbe essere quello di aumentare il quantitativo di questo metabolita per assicurarne un'adeguata produzione (Pierson III *et al.*, 1995).

I geni *phzA* e *phzD* codificano per una 2,3-diidro-2,3-diidrossi benzoato sintetasi, molto simile a quella prodotta rispettivamente dai geni *entB* e *pdxH* di *E. coli*. La funzione delle proteine PhzA e PhzD potrebbe essere quella di stabilizzare il complesso di macromolecole necessarie per la sintesi delle fenazine (Ching-A-Woeng *et al.*, 1998).

Il gene *phzB* mostra un'elevata similarità nei confronti dei geni *trpG* di *P. aeruginosa* e *trpE* di *Rhizobium meliloti*, che codificano per entrambe le subunità dell'antralinato sintetasi. La similarità tra questi geni supporta l'ipotesi di una conservazione, tra diverse specie e generi batterici, della capacità di sintetizzare fenazine. Il ruolo dell'acido antranilico non è stato ancora ben chiarito. A riguardo

esistono due ipotesi: per la prima la proteina PhzB avrebbe solo la funzione di stabilizzare l'intera via metabolica; per la seconda invece l'acido antralinico avrebbe il ruolo di rimuovere il gruppo dell'acido piruvico dall'acido corismico durante la sintesi della fenazina PCA.

Infine l'espressione del gene *phzC* permette la conversione di PCA in 2-OH-PCA. La proteina PhzC potrebbe essere un agente metilante come lo è ThyA di *Mycobacterium tuberculosis*, il gene ad esso più simile. La via metabolica che porta alla biosintesi delle fenazine, proposta da Pierson *et al*, 1995, è la seguente:

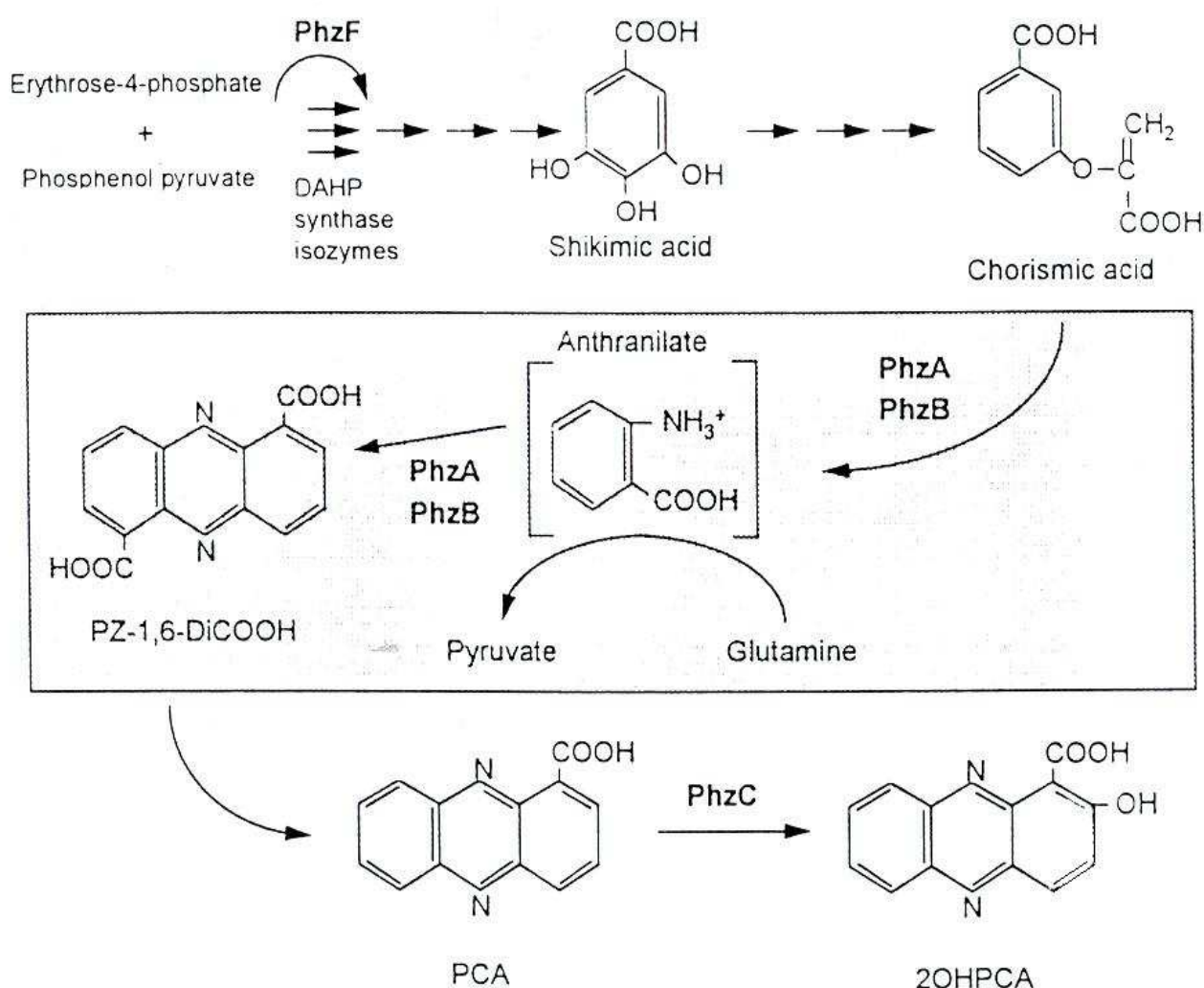


Fig. 1.5 Catena metabolica proposta come modello per la sintesi di PCA e 2-OH-PCA.
Da Pierson III *et al*, 1995.

La trascrizione dell'operone delle fenazine è regolato da diversi meccanismi molecolari che danno vita ad un interessante network biologico che ha fatto del ceppo *P. aureofaciens* 30-84 un ceppo modello per lo studio della produzione di metaboliti secondari.

7. Fenomeno del Quorum Sensing

I batteri, sebbene sono stati tradizionalmente considerati come organismi unicellulari, hanno sviluppato diverse strategie molecolari per poter svolgere determinate attività metaboliche secondo meccanismi riconducibili alle modalità presenti negli organismi multicellulari. La maggior parte dei batteri è in grado di produrre piccole molecole segnali liberamente diffondibili, che nella letteratura sono state comunemente denominate feromoni. Tali molecole costituiscono segnali intraspecifici riconoscibili dai batteri produttori (Fuqua *et al.*, 1996). È stato ipotizzato che un batterio possa riconoscere la propria densità di popolazione nel momento in cui le molecole segnali raggiungono una concentrazione (quorum) tale che possa permettere il legame dei feromoni con proteine target (solitamente fattori trascrizionali), che sono alla base di pathway metabolici. Il fenomeno che nei batteri mette in relazione la densità di popolazione con la regolazione genica è stato denominato “Quorum Sensing” (Fuqua *et al.*, 1996).

Uno degli esempi più importanti del fenomeno quorum sensing è espressione genica mediata dalla molecola segnale N-acil omoserina lattone (AHL). Il sistema AHL maggiormente studiato è il sistema identificato e caratterizzato nel batterio Gram negativo *Vibrio fischerii* capace di regolare la sua proprietà di bio-luminescenza mediante un sistema dipendente dalla propria densità batterica. La produzione di bioluminescenza ha inizio ad una concentrazione batterica minore del normale nel momento in cui il supernatante di colture batteriche di *Vibrio fischerii* sterilizzate sono state utilizzate per allevare nuovamente i batteri. L'analisi genetica ha rivelato che un gene, denominato *luxI*, codifica per una sintetasi responsabile per la produzione di una molecola autoinduttrice N-3-ossosanoil omoserina lattone (OHHL). Una volta che OHHL raggiunge un valore di concentrazione soglia o quorum, essa va a legarsi ad un fattore trascrizionale, codificato dal gene *luxR*.

L'enzima LuxR è una proteina modulare composta di un dominio deputato al legame con la molecola segnale nella sua estremità ammino terminale, mentre nella sua estremità carbossiterminale è presente un motivo deputato al legame di una sequenza palindromica, denominata “lux box” di circa 20 bp posizionato a monte della regione -35 del promotore dell'operone *lux* (*luxICDABEG*), che contiene i geni codificanti per l'enzima luciferasi ed il complesso enzimatico acido grassi reduttasi (Fuqua *et al.*, 1996).

Sistemi regolatori simili sono stati identificati in altri batteri Gram negativi, in quasi tutti i casi sono stati caratterizzati prodotti genici omologhi di LuxI e LuxR, aventi le medesime attività regolatorie. La principale differenza tra i sistemi quorum sensing risiede nella struttura delle molecole segnali, che presentano sempre la componente lattonica differenziandosi nella lunghezza e composizione della catena acilica.

Gli autoinduttori AHL controllano l'espressione di fattori di virulenza e la produzione di metaboliti secondari in *P. aeruginosa*, la produzione di antibiotici e fattori di virulenza in *Erwinia carotovora*, il trasferimento plasmidico in *Agrobacterium tumefaciens* ed infine la mobilità delle cellule di *Serratia liquifaciens* (Fuqua *et al.*, 1996).

Vibrio fischerii ha sviluppato un rapporto simbiotico con la seppia delle Hawaii *Euprymna scolopes*, che si avvale della bioluminescenza del batterio. Il quorum sensing consente di convogliare energie nella produzione di luminescenza soltanto nel momento in cui il batterio raggiunge una concentrazione determinata, che di solito è capace di raggiungere solo all'interno del suo ospite. Al di fuori del proprio ospite *Vibrio fischerii* non raggiunge mai densità batteriche tali da attivare il pathway metabolico della bioluminescenza. Per quanto concerne i batteri patogeni, è ipotizzabile che la produzione di fattori di virulenza sia attivata soltanto nel momento in cui le proprie popolazioni raggiungano delle densità tali da poter superare le risposte di difesa degli organismi ospiti (Fuqua *et al.*, 1996).

8. Sistema PhzI/PhzR in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84

Una libreria cosmidica del ceppo *P. aureofaciens* 30-84 è stata introdotta *in trans* in un ceppo reporter denominato *P. aureofaciens* 30-84 ZN in cui il gene *phzB* è stato sostituito dal gene reporter *lacZ* (*phzB::lacZ*), permettendo in tal modo di quantificare l'espressione del gene suddetto.

Mediante tale approccio è stato identificato un regolatore della biosintesi delle fenazine a monte dell'operone delle fenazine (*phzXYFABCD*). Tale gene è stato denominato *phzR* e mediante analisi di sequenza è stata dedotta la similarità con il fattore trascrizionale LuxR di *Vibrio fischerii*. Pierson e Wood 1994 hanno dimostrato che la produzione delle fenazine è strettamente dipendente dalla funzionalità dell'enzima PhzR. Nello stesso lavoro, Pierson e Wood, hanno dimostrato che surnatanti di colture batteriche di *P. aureofaciens* 30-84 sterilizzate producevano un incremento nella espressione di

phzB::lacZ, fornendo le evidenze che la biosintesi delle fenazine è regolata da un fenomeno di quorum sensing (Fig. 1.6).

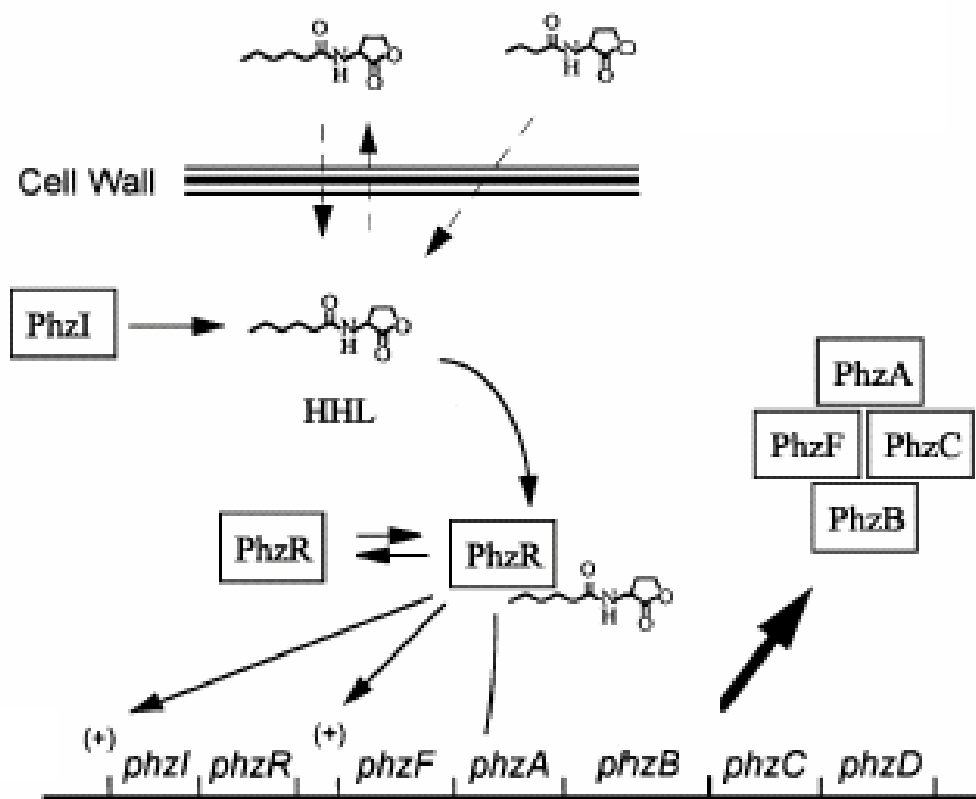


Fig 1.6 Fenomeno del Quorum Sensing in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. modificato da Pierson et al. 1998

L'analisi della regione genomica a monte di *phzR* ha rivelato un open reading frame che ha presentato una omologia del 49% con *luxI* di *Vibrio fischerii* (Wood e Pierson 1996). Nel 1997 Wood et al. hanno identificato la molecola autoinduttrice sintetizzata da PhzI come un N-esanoil omoserina lattone (HHL).

Negli ultimi anni è stato identificato un secondo sistema quorum sensing basato sulla funzione della coppia di geni *csaI* e *csaR*. Ceppi di *P. aureofaciens* 30-84 mancanti di copie funzionali di *csaI* o *csaR* non presentavano una riduzione nella produzione di fenazine, sebbene l'introduzione di copie multiple dei geni suddetti nel ceppo reporter *P. aureofaciens* 30-84 ZN producesse un incremento nella trascrizione di *phzB::lacZ* (Zhang e Pierson, 2001). È stato ipotizzato che questo sistema di quorum sensing non è normalmente correlato alla biosintesi delle fenazine.

È stato verificato che mutazioni duplici in *phzI/csaI* o *phzR/csaR* comportavano la riduzione completa della produzione sia di fenazine sia di esoproteasi (Zhang e Pierson 2001) da cui è stato ipotizzato che i due sistemi interagiscano tra loro per la produzione di proteasi.

Ceppi di *P. aureofaciens* 30-84 aventi geni *phzI* e *csaI* non funzionali, oppure ceppi mutati solo nel gene *csaR*, presentavano una morfologia mucoide quando allevate su King' S Medium B. Tale morfologia può essere riconvertita alla morfologia caratterizzante il ceppo wild type mediante l'aggiunta di molecole segnali prodotte da *csaI* (nel caso di mutanti in *phzI* e *csaI*) o l'introduzione *in trans* di vettori aventi un gene *csaR* funzionale, per quanto concerne i mutanti nel gene *csaR*. Tali dati lasciano supporre che questo sistema regolatorio sia legato alle funzioni della membrana cellulare, e che pertanto il batterio possa controllare alcune proprietà della costituzione cellulare sulla base della propria densità cellulare (Zhang e Pierson 2001).

9. Il fattore RpeA

Wisthler e Pierson nel 2003 hanno caratterizzato un ceppo mutante di *P. aureofaciens* 30-84 capace di produrre una quantità maggiore di fenazine rispetto il ceppo wild type sia su terreni di coltura complessi che minimi. È stato verificato che il livello di molecole segnali prodotto in tale ceppo over produttore di fenazine non differiva dalla quantità prodotta nel wild type

Il fenotipo caratterizzato da Wisthler e Pierson nel 2003, deriva da un inserzione di un trasposone in un gene codificante per una istidina chinasi che presenta una omologia di sequenza del 34% con il prodotto proteico del gene *rstB* in *E. coli*. Il gene di *P. aureofaciens* 30-84 è stato denominato *rpeA*, acronimo di “repressor of phenazine expression A”. La regione a monte del gene *rpeA* presenta similarità con *rstA*, che con *rstB*, fanno parte di un sistema a due componenti di cui non è stata ancora caratterizzata la funzione.

Nel lavoro di Wisthler e Pierson del 2003 è stato creato un doppio mutante mancante sia di PhzR sia di RpeA. Tale ceppo è in grado di produrre le fenazine lasciando ipotizzare che l'attività repressoria di RpeA sia esplicita attraverso un meccanismo di regolazione che esula dal sistema di quorum sensing.

10. Il sistema a due componenti GacS/GacA

In diverse specie di pseudomonadi fluorescenti, l'espressione di geni coinvolti nella biosintesi di metaboliti secondari ed enzimi extracellulari è controllata positivamente dal sistema a due componenti GacS/GacA. Tale sistema regolatorio consiste di un enzima legato alla membrana con attività chinasi (GacS) e da una proteina regolatoria citoplasmatica (GacA) (Heeb e Haas, 2001). L'elevato grado di conservazione della sequenza nucleotidica del gene *gacA* all'interno del gruppo *Pseudomonas* "sensu stricto" lo ha reso un marker genetico utile nella diagnosi di tali batteri, permettendone anche una distinzione filogenetica da generi batterici precedentemente afferenti al genere *Pseudomonas*, come ad esempio *Xanthomonas* e *Burkholderia* (de Souza *et al.*, 2003).

Per quanto concerne il funzionamento di tale sistema regolatorio è stato proposto che GacS sia in grado di riconoscere uno specifico stimolo ambientale, tuttora sconosciuto, ed in seguito a tale riconoscimento GacS è in grado di attivare, mediante fosforilazione, l'enzima GacA, che a sua volta è deputato all'espressione di determinati geni. (Applevy *et al.*, 1996; Heeb e Haas, 2001; Pernesting *et al.*, 2001).

Il gene *gacS* (detto anche *lemA*) codificante per una istidina chinasi è stato descritto per la prima volta in *P. syringae* pv. *syringae* in cui tale gene è responsabile per la formazione di lesioni su foglie di *Phaseolus vulgaris* L. (Willis *et al.*, 1990; Willis *et al.*, 1994), ed anche della produzione della tossina siringomicina e dell'attività proteasica (Hrabak *et al.*, 1993).

In diversi studi riguardanti *P. syringae* è stato verificato che la funzione della proteina GacS o LemA sembra essere patovar specifica, sebbene il gene *gacS* (*lemA*) sia fisicamente conservato all'interno della specie batterica. Come detto in precedenza GacS è necessario per la formazione di lesioni in *P. syringae* pv. *syringae*, in *P. syringae* pv. *coronofaciens* esso è indispensabile per la produzione della tabtossina ma non per la formazione di lesioni, mentre in *P. syringae* pv. *phaseolicola* non è richiesta per la produzione di faseolotossina e per la formazione di lesioni (Willis *et al.*, 1990; Barta *et al.*, 1992; Rich *et al.*, 1994).

La proteina regolatoria GacA (Global activator of cyanide and antibiotic production) è stata identificata per la prima volta nel ceppo di biocontrollo *P. fluorescens* CHA0 dove è richiesta per la produzione di composti antimicrobici quali 2,4-diacetilfluoroglucinolo, pioluteorina, pioverdina ed acido cianidrico, e di enzimi quali la

fosfolipasi C ed esoproteasi (Oberhansil e Defago, 1991; Laville *et al.*, 1992; Sacherer *et al.*, 1994; Laville *et al.*, 1998; Schnider-Keel *et al.*, 2000; Maurhofer *et al.*, 2001).

È stato ipotizzato che GacA, una volta attivato da GacS, sia in grado di regolare la trascrizione di determinati geni mediante l'interazione diretta con domini *in cis*, in virtù del dominio "helix-turn-helix" presente nella sua estremità carbossiterminale (Laville *et al.*, 1992).

Il sistema GacS/GacA, nonostante che i geni controllati da GacA non sono stati ancora identificati, esercita un effetto positivo su i sistemi di regolazione genica mediata dai segnali N-acil omo-serina lattone in tre specie batteriche afferenti al genere *Pseudomonas*, e cioè *P. aeruginosa*, *P. syringae* e, quindi, *P. aureofaciens* (Reimann *et al.*, 1997; Kitten *et al.*, 1998; Chancey *et al.*, 1999).

Nel ceppo *P. aureofaciens* 30-84 sono stati isolati due mutanti incapaci di produrre proteasi, acido cianidrico e fenazine. Chancey *et al.* (1999) hanno provato che tali mutanti non sono in grado di produrre nuovamente i composti fenazinici mediante l'introduzione *in trans* di geni funzionali *phzI*, *phzR* o l'intero operone delle fenazine. Una delle mutazioni è stata complementata mediante l'introduzione *in trans* di una regione genomica di *P. aureofaciens* 30-84 codificante per GacA, mentre la seconda mutazione è stata complementata mediante l'introduzione *in trans* di un gene omologo *gacS* di *P. fluorescens*. Tali mutanti hanno presentato livelli normali della trascrizione di *phzR* ma allo stesso momento hanno presentato una espressione ridotta del gene *phzI*. Tali risultati hanno indicato che GacS/GacA esplicano il proprio controllo sulla produzione di fenazine attraverso la trascrizione di *phzI* ma, nonostante ciò, è stato dimostrato che i ceppi mutanti esaminati non erano in grado di produrre fenazine anche quando allevate su substrati addizionati con molecole segnali esogene.

In diversi lavori è stata evidenziata l'interazione del sistema GacS/GacA su i fattori RpoS e sul sistema regolatorio RsmA/*rsmZ*.

11. Il fattore sigma S (RpoS)

Uno dei metodi maggiormente utilizzati dai batteri per operare un cambiamento nel metabolismo cellulare consiste nell'indirizzare l'espressione genica mediante l'uso di fattori sigma (RpoD, RpoS, RpoN, ecc) che alterano la specificità della RNA polimerasi nel riconoscimento dei promotori (Ishihama, 2000).

Il fattore sigma della fase stazionaria, codificato dal gene *rpoS*, indicato in letteratura come σ^S , σ^{38} oppure RpoS è stato descritto per la prima volta in *E. coli*. Il termine fase stazionaria indica uno stadio fisiologico in cui la popolazione batterica riduce la propria crescita rallentando la velocità di divisione cellulare. In *E. coli* RpoS controlla più di 100 geni coinvolti nella resistenza a diversi tipi di stress e nella virulenza (Loewen *et al.*, 1998; Ishishama, 2000). In *E. coli* i livelli di RpoS sono controllati attentamente dato che la concentrazione di tale subunità sigma deve soltanto raggiungere un valore pari al 30% della concentrazione del fattore costitutivo RpoD o σ^{70} affinché possa determinare l'espressione del pool genico (definito regulone σ^S) responsabile del passaggio alla fase stazionaria (Jishage *et al.*, 1996).

Il fattore RpoS è stato identificato e caratterizzato in diverse pseudomonadi fluorescenti (Sarniguet *et al.*, 1995; Ramos-Gonzales e Molin, 1998; Suh *et al.*, 1998). In *P. aeruginosa*, RpoS è coinvolta nella produzione di alginato ed esotossina A (Suh *et al.*, 1999), mentre in *P. fluorescens* è coinvolta nella produzione di antibiotici (Sarniguet *et al.*, 1995).

Negli anni sono stati identificati differenti pathway di controllo del fattore sigma S ed in *P. fluorescens* Pf5 è stato evidenziato il controllo positivo del sistema GacS/GacA sulla trascrizione del gene *rpoS* (Whistler *et al.*, 1998). Nei mutanti *gacA* e *gacS* di tale ceppo è stato evidenziato che il costrutto reporter *rpoS::lacZ* presentava una riduzione nella produzione di attività galattosidasi pari al 20% del livello di attività prodotta dal ceppo wild type. In *Azotobacter vinelandii*, specie batterica afferente alla famiglia delle *Pseudomonaceae* e molto prossima filogeneticamente al genere *Pseudomonas*, è stata verificata l'assenza dell'mRNA di *rpoS* durante la fase stazionaria in mutanti *gacA* (Castaneda *et al.*, 2001). Non è stato tuttora chiarificato se il ruolo svolto dal sistema GacS/GacA sia diretto o indiretto.

È stato ipotizzato che il fenomeno del quorum sensing possa influenzare l'espressione del gene *rpoS* dato che GacS/GacA è legato alla produzione di feromoni. Tale ipotesi è stata valutata in *P. aeruginosa* in cui sono presenti due sistemi di quorum sensing ovvero LasI/LasR e RhII/RhlR.

I lavori presentati da Latifi *et al.*, (1996) e Whithley *et al.*, (2000) hanno prodotto risultati contraddittori. Nel lavoro di Latifi *et al.*, infatti, è stato dimostrato l'attività regolatoria positiva del fattore trascrizionale RhlR sull'espressione della fusione genica *rpoS::lacZ* riportata su di un vettore in *E. coli*, nel momento in cui tale ceppo reporter

veniva allevato su substrati contenenti il feromone prodotto da RhII. Contrariamente Whitlhey *et al.* (2000), hanno dimostrato *P. aeruginosa* mancante di un gene *rpoS* funzionale ha la capacità di produrre un maggior quantitativo di piocianine, la cui produzione è regolata dal sistema RhII/RhIR.

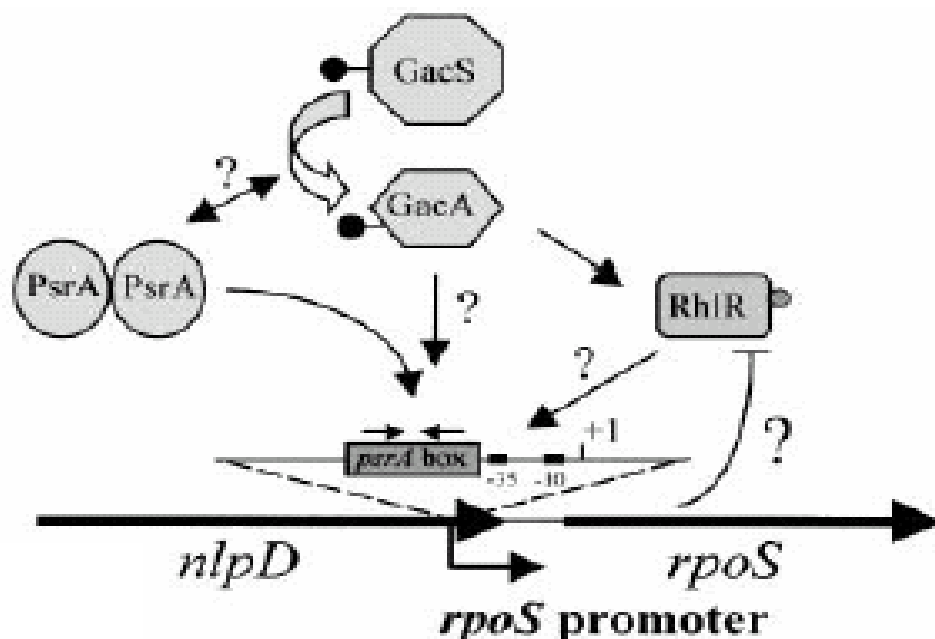


Fig. 1.7 Ipotetico meccanismo di controllo di *rpoS* in *Pseudomonas aeruginosa* (modificato da Venturi, 2001).

Kojic e Venturi, nel 2001 hanno identificato e caratterizzato il fattore di trascrizione PsrA (Pseudomonas sigma regulator A) in *P. putida* e *P. aeruginosa*, fattore coinvolto nella trascrizione di *rpoS*. Mutanti *psrA* deficienti, difatti, in entrambe le specie hanno esibito una riduzione del 90% dell'attività del promotore di *rpoS* ed una riduzione del 50% nei livelli del fattore sigma S (Kojic e Venturi, 2001).

Una sequenza di 25 nucleotidi è stata caratterizzata in studi riguardanti l'interazione del fattore PsrA e il promotore di *rpoS*. In tale regione, altamente conservata in *P. aeruginosa* e *P. putida*, è stata evidenziata una regione palindromica (c/gaac N₂₋₄ gttg/c) che è stata proposta come la regione *in cis* ("psrA box") riconosciuta dal dominio deputato al legame del DNA presente all'estremità amminotermine del fattore PsrA (Fig. 1.7).

Il gene codificante per RpoS è stato clonato nel ceppo 30-84 di *P. aureofaciens* ed è stato studiato il coinvolgimento di tale fattore sigma nella produzione di fenazine. È stato verificato che RpoS è richiesto per la produzione di composti di fenazinici in substrati minimi. Il ceppo mutante 30-84 S, mancante di un gene *rpoS* funzionale, produce una quantità inferiore di fenazine rispetto il ceppo wild type, nel momento in cui è allevato in

substrati minimi, mentre si ha l'effetto inverso quando il ceppo mutante è allevato su substrati complessi (Blachere e Pierson dati non pubblicati). I dati alquanto contrastanti suggeriscono che la regolazione delle fenazine mediata da RpoS fa parte di un sistema più complesso in cui debbano essere considerati altri fattori quali GacS/GacA, PhzI/PhzR ed il sistema RsmA/*rsmZ*.

12. Meccanismo di controllo post-trascrizionale: RsmA/*rsmZ*

Nella sottospecie *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, la produzione di esoenzimi e fattori di virulenza sono controllati in modalità post-trascrizionale mediante l'attività della proteina RsmA (Chatterjee et al., 1995). Tale fattore proteico, omologo di CsrA di *E. coli* e *Salmonella enterica*, è deputato al legame in regioni prossime alla sequenza Shine e Dalgarno di RNA messaggeri di geni target favorendone la degradazione (Chatterjee et al., 1995; Haas et al., 2002). Le molecole di mRNA regolatorio RsmB di *E. carotovora* e CsrB di *E. coli* hanno la capacità di controllare l'attività dei fattori RsmA e CsrA, legandosi ad essi ed evitando, in tal modo, il legame con gli mRNA bersagli (Chatterjee et al., 1995; Romeo 1998; Gudapaty et al., 2001). Nel ceppo *P. fluorescens* CHA0, RsmA è un importante regolatore negativo dei processi metabolici attivati e controllati dal sistema regolatorio GacS/GacA (Blumer et al., 1999; Blumer e Haas, 2000) mentre *rsmZ* è un mRNA regolatorio capace di legare e sequestrare il fattore "RNA binding" RsmA (Heeb et al., 2002).

Heeb et al., (2002) hanno dimostrato che l'espressione di *rsmZ* dipende dalla funzionalità di GacA, inoltre è stato dimostrato che l'overespressione di tale molecola di RNA comporta la soppressione di mutazione nei geni *gacA* e *gacS*, ed infine l'espressione di *rsmZ* è stimolata da una molecola segnale prodotta in *P. fluorescens* CHA0 avente un sistema GacS/GacA funzionale. Tale segnale non è stato ancora identificato, ma non è riconducibile alla famiglia delle N-acil omoserina lattoni (Heeb et al., 2002).

Un gene omologo a *rsmA* è stato identificato in *P. aureofaciens* 30-84 e la distruzione di tale gene nel ceppo 30-84 W (GacA⁻) ZN (*phzB::lacZ*) ha comportato il ripristino di un livello di trascrizione dell'operone delle fenazine comparabile con il grado di espressione del ceppo 30-84 ZN (Lee e Pierson in pubblicazione). Una sequenza nucleotidica posizionata a valle del gene codificante per RpoS (Blachere e Pierson dati non pubblicati) ha presentato un'omologia del 94,5% con il gene codificante per *rsmZ* in *P. fluorescens* CHA0. Tale gene è stato clonato in un plasmide a valle di un promotore

costitutivo (P_{tacS}) ed è stato verificato che la sua overespressione di *rsmZ* ha la capacità di sopprimere l'effetto negativo di una mutazione in *gacA* o *gacS*; inoltre è stato dimostrato che il fattore GacA è in qualche modo correlato all'attività del promotore di *rsmZ* (Lee e Pierson in pubblicazione).

La produzione dei tre composti fenazinici costituisce un elevato costo metabolico che *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 tende a regolare mediante la funzione di diversi meccanismi molecolari. Al momento non è del tutto chiaro quali siano le modalità con cui i sistemi finora descritti si intrecciano tra loro e non sono stati ancora descritti i pathway regolatori attivati da RpeA, come del resto sono tuttora sconosciuti i geni direttamente regolati da GacA. Il tutto rende la biosintesi delle fenazine un ottimo modello per poter elucidare processi evolutivisti che hanno portato alla selezione di processi metabolici tanto delicati e perfetti da garantire alla specie *Pseudomonas aureofaciens* un vantaggio nell'ambito della selezione naturale.

13. Scopo della tesi

La prima parte del presente lavoro di tesi ha avuto come scopo il monitoraggio della biodiversità presente in alcuni agroecosistemi e l'identificazione, all'interno di un consistente numero di isolati, di quelli afferenti al gruppo degli pseudomonadi fluorescenti in modo da poter ricercare tra essi dei potenziali agenti di biocontrollo. Conclusa questa prima fase si è cercato di comprendere quali fossero i meccanismi che rendevano attivi questi batteri contro i funghi fitopatogeni saggiati *in vitro*; particolare interesse è stato attribuito all'accertamento della produzione di metaboliti secondari implicati nel biocontrollo. L'attività di antibiosi, dimostrata *in vitro*, è stata poi saggiata anche *in vivo* per verificare l'eventuale possibilità d'impiego reale di questi batteri come biofitofarmaci naturali.

Una seconda parte del nostro lavoro si è centrata sullo studio dei meccanismi molecolari che regolano la biosintesi delle fenazine nel ceppo di biocontrollo *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. La regione intergenica localizzata tra il gene *phzR* e l'operone delle fenazine è stata caratterizzata per poter identificare la regione del promotore dell'operone delle fenazine e le diverse componenti *in cis* che vanno ad influenzare l'attività del suddetto promotore. Un'ulteriore parte del lavoro ha interessato la caratterizzazione di una regione genomica dei *P. aureofaciens* 30-84

con la successiva identificazione dei vari geni ivi localizzati e caratterizzazione dei ruoli svolti dai geni all'interno della biosintesi delle fenazine.

Capitolo II

Materiali e Metodi

1. Ceppi batterici e Plasmidi

I ceppi batterici ed i plasmidi utilizzati in questo studio sono riportati nelle tabelle 2.1 e 2.2. Tutti i ceppi di *Escherichia coli* sono stati incubati a 37°C mentre i ceppi di *Pseudomonas aureofaciens* 30-84, i relativi ceppi mutanti e tutti gli isolati batterici identificati durante tale lavoro sono stati incubati a 28°C. Tubi di vetro 18x180 mm sono stati utilizzati per tutte le colture batteriche con volumi inferiori ai 10 ml, mentre beute Erlenmeyer da 50 or 125 or 250 ml sono state utilizzate per colture batteriche allevate in volumi superiori ai 10 ml. Tutte le colture liquide sono state insemenzate partendo da colture su substrato solido insemenzate con cellule batteriche provenienti da sospensioni in stock di glicerolo.

2. Substrati e Soluzioni

Tutti i substrati colturali utilizzati nel corso del lavoro sono stati riportati nella tabella 2.3. Il substrato LB liquido ed agarizzato è stato utilizzato sia per i ceppi di *E. coli* che per i ceppi di *P. aureofaciens*, mentre NAG (Nutrient Agar Glucose) è stato utilizzato per la crescita degli isolati batterici collezionati da diversi siti della regione Campania (Italia). Il substrato PDA (Potato Dextrose Agar) è stato utilizzato per la caratterizzazione di isolati batterici afferenti al gruppo delle pseudomonadi fluorescenti. Gli antibiotici e le sostanze reporter sono stati utilizzati alle seguenti concentrazioni: rifampicina 100 mg/L, kanamicina 50 mg/L and X-Gal 2%. La tetraciclina è stata utilizzata ad una concentrazione di 25mg/L per i ceppi di *E. coli* e 50 mg /L per i ceppi derivanti dallo studio su di *P. aureofaciens* 30-84, mentre il cloramfenicolo è stato utilizzato alla concentrazione di 60 mg/L per *E. coli* e 400 mg/L per

Ceppi ed Isolati	Caratteristiche importanti	Riferimento
<i>P. aureofaciens</i> 30-84	Wild type Phz ⁺ Rif ^R	Pierson et al., 1994
<i>P. aureofaciens</i> 30-84 Z	Phz ⁻ phzB::lacZ	Pierson et al., 1994
<i>P. aureofaciens</i> 30-84 Ice	Phz ⁻ phzB::inaZ	Wood et al., 1997
<i>P. aureofaciens</i> 30-84 W	Phz ⁻ gacA ⁻	Wood et al., 1997
<i>P. aureofaciens</i> 30-84 I	Phz ⁻ phzI ⁻	Wood et al., 1996
<i>P. aureofaciens</i> 30-84 R	Phz ⁻ phzR ⁻	Wood et al., 1996
<i>P. aureofaciens</i> 30-84 RpeA-	Phz ⁺ rpeA ⁻	Whistler e Pierson 2001
<i>P. aureofaciens</i> 30-84 RpeA- Z	Phz ⁺ rpeA ⁻ phzB::lacZ	Whistler e Pierson 2002
<i>P. aureofaciens</i> 30-84 S	Phz ⁺ rpoS ⁻	Blachere e Pierson non pubblicato
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ recA ⁻ endA ⁻ hsdR ⁻ supE44 thi ⁻ gyrA96 relA1 Δ(argF ⁻ lacZYA) Il69 φ80lacZ DM15	Gibco-BRL
<i>E. coli</i> HB101	F ⁻ hsdS 20(r _B ⁻ m _B ⁻) supE44 recA1 ara ⁻ 14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl ⁻ 5 mtl ⁻ 5	Gibco-BRL
<i>E. coli</i> MC1061	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZ ΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 ara Δ139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG	Gibco-BRL
Mipaf 9	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 17	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 19	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 20	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 22	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 24	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 26	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 45	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 49	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 50	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 51	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 52	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 54	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 62	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 71	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 72	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 73	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 80	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 88	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 109	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 114	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 115	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 116	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 117	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 118	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 119	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 120	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 121	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Mipaf 122	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
AF1	<i>pseudomonade fluorescente</i>	Questo studio
Strain LMG 5916	<i>P. fluorescens</i> biovar I	Laboratorium Microbiologic Universiteit Gent, Belgium
Strain LMG 14674	<i>P. fluorescens</i> biovar III	Laboratorium Microbiologic Universiteit Gent, Belgium
Strain LMG 5833	<i>P. fluorescens</i> biovar V	Laboratorium Microbiologic Universiteit Gent, Belgium
Strain LMG 14681	<i>P. putida</i>	Laboratorium Microbiologic Universiteit Gent, Belgium
Strain LMG 2352	<i>P. viridiflava</i>	Laboratorium Microbiologic Universiteit Gent, Belgium
Strain LMG 2339	<i>P. tolaasii</i>	Laboratorium Microbiologic Universiteit Gent, Belgium

Tab. 2.1: Ceppi ed isolati batterici

Vettori plasmidici	Caratteristiche rilevanti	Riferimento
pLAFR3	<i>cos</i> <i>rlx</i> ⁺ Tet ^R IncP1	Staskawowicz et al., 1987
pLAF15-25	pLAFR3 with <i>P.a.</i> 30-84 genomic region in <i>EcoRI</i> site	Questo studio
pLAF24-47	pLAFR3 with <i>P.a.</i> 30-84 genomic region in <i>EcoRI</i> site	Questo studio
pLAF13-6	pLAFR3 with 9 Kb <i>P.a.</i> 30-84 genomic region in <i>EcoRI</i> site	Questo studio
pLAF-R4000	pLAF13-6 derivative	Questo studio
pLAF-R5000	pLAF13-6 derivative	Questo studio
pLAF-RH8000	pLAFR3 with 3 Kb pLAFR5000 insert in <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> sites	Questo studio
pLAF-RH1700	pLAFR3 with 1.7 Kb pLAFR5000 insert in <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> sites	Questo studio
pLAF-RH500	pLAFR3 with 0.5 Kb pLAFR5000 insert in <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> sites	Questo studio
pLAF- <i>psrA</i>	pLAFR3 with <i>psrA</i> cloned in <i>EcoRI</i> and <i>BamHI</i> sites	Questo studio
pLAF- <i>psrA-Cter</i>	pLAFR3 with <i>psrA</i> C-terminal region cloned in <i>EcoRI</i> and <i>BamHI</i> sites	Questo studio
pLAF- <i>mtnP</i>	pLAFR3 with <i>mtnP</i> cloned in <i>EcoRI</i> and <i>BamHI</i> sites	Questo studio
pKT2	Km ^R , contains promoterless GFP	Miller et al., 2000
pKT2- <i>lacZ</i>	Km ^R , contains promoterless GFP and <i>lacZ</i>	Questo studio
pKT2-0.9	pKT2 containing 0.9 Kb <i>phzR-phzX</i> intergenic region	Questo studio
pKT2-0.9 <i>lacZ</i>	pKT2- <i>lacZ</i> containing 0.9 Kb <i>phzR-phzX</i> intergenic region	Questo studio
pKT2-F1R1 <i>lacZ</i>	pKT2- <i>lacZ</i> with 356 bp promoter insert driving <i>lacZ</i>	Questo studio
pKT2-F1R2 <i>lacZ</i>	pKT2- <i>lacZ</i> with 245 bp promoter insert driving <i>lacZ</i>	Questo studio
pKT2-F3R1 <i>lacZ</i>	pKT2- <i>lacZ</i> with 147 bp promoter insert driving <i>lacZ</i>	Questo studio
pKT2-F1R2-TcR <i>lacZ</i>	pKT2- <i>lacZ</i> with 245 bp promoter insert driving <i>lacZ</i> , Tet ^R	Questo studio
pKT2-0.9- <i>uidA-cat-lacZ</i>	pKT2- <i>lacZ</i> with 900 bp promoter insert driving <i>lacZ</i> and <i>uidA</i> ; Cm ^R	Questo studio
pKT2-F1R1- <i>uidA-cat-lacZ</i>	pKT2- <i>lacZ</i> with 356 bp promoter insert driving <i>lacZ</i> and <i>uidA</i> ; Cm ^R	Questo studio
pKT2-F1R2- <i>uidA-cat-lacZ</i>	pKT2- <i>lacZ</i> with 245 bp promoter insert driving <i>lacZ</i> and <i>uidA</i> ; Cm ^R	Questo studio
pKT2- <i>PrsmZ-lacZ</i>	pKT2- <i>lacZ</i> containing a 4.7 Kb <i>HindIII-EcoRI</i> overdriving <i>lacZ</i>	Lee e Pierson non publ.
pPR510	Cm ^R	Quigley e Reedley, 1987
510-R5000	pPR510 containing 5 Kb pLAF13-6 insert	Questo studio
510-RS3000	pPR510 with 3 Kb pLAFR5000 insert in <i>EcoRI-SalI</i> sites	Questo studio
510-RS1700	pPR510 with 1.7 Kb pLAFR5000 insert in <i>EcoRI-SalI</i> sites	Questo studio
510-RS500	pPR510 with 0.5 Kb pLAFR5000 insert in <i>EcoRI-SalI</i> sites	Questo studio
510- <i>psrA</i>	pPR510 with <i>psrA</i> cloned in <i>EcoRI</i> and <i>BamHI</i> sites	Questo studio
510- <i>psrA-Cter</i>	pPR510 with <i>psrA</i> C-terminal region cloned in <i>EcoRI</i> and <i>BamHI</i> sites	Questo studio
510- <i>lexA</i>	pPR510 with <i>lexA</i> cloned in <i>EcoRI</i> and <i>BamHI</i> sites	Questo studio
510- <i>mtnP</i>	pPR510 with <i>mtnP</i> cloned in <i>EcoRI</i> and <i>BamHI</i> sites	Questo studio
pWM4	<i>uidA-cam</i> cartridge	Metcalf e Wanner, 1993
pHP45-Tc	interposon Tet ^R cartridge	Feliay et al., 1987

Tabella 2.2: Plasmidi utilizzati nel corso del lavoro

Substrato	Ingredienti	Substrato	Ingredienti
Luria Bertani (LB) broth/agar	10g Bacto Tryptone Peptone 5g Yeast extract 5g NaCl 1000 ml ddH ₂ O	Minimal Medium 9 (M9) broth/agar	50 ml 20X M9 Salts 2 ml 1M MgSO ₄ x 7H ₂ O 10 ml 20% Glucose 100 µl 1M CaCl ₂ 2 ml 1 mg/ml thiamine 2 ml 1mg/ml biotine 15 agar 940 ml ddH ₂ O pH 7.4
LB Paba	1.6g PABA Sodium Salt 5g Yeast extract 5g NaCl 1000 ml ddH ₂ O 15g agar	Skim Milk agar	80g Skim Milk powder 1000 ml ddH ₂ O 15g agar
Pigment Producing Media (PPMD) broth/agar	20g Proteose Peptone N°3 5g NaCl 1g KNO ₃ 10 ml Glycerol 1000 ml ddH ₂ O 15g agar pH 7.2	Nutrient Agar Glucose (NAG) broth/agar	8g Nutrient broth 2.5g Glucose 18g agar 1000 ml ddH ₂ O pH 7
King's Medium B (KMB) agar	20g Proteose Peptone N°3 1.5 g K ₂ HPO ₄ 1.5 g MgSO ₄ x 7H ₂ O 10 ml Glycerol 1000 ml ddH ₂ O 15g agar	Potato Dextrose Agar (PDA)	39.5g Potato Dextrose Agar 1000 ml ddH ₂ O

Tabella 2.3: Substrati

Soluzioni	Ingredienti	Soluzioni	Ingredienti
20X M9 Salts	60g Na ₂ HPO ₄ 30g KH ₂ PO ₄ 10g NH ₄ Cl 5g NaCl 400 ml ddH ₂ O	T ₁₀ E ₁	1.25 2 M Tris (pH 8.0) 0.5 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) 248.25 ml ddH ₂ O
Birnie I	4.5 ml 20% Glucose 2 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) 1.25 ml 2 M Tris (pH 8.0) 92.25 ml ddH ₂ O	T ₅₀ E ₅₀ NaCl	25 ml 3M NaCl 2.6 ml 3 M Tris (pH 8.0) 11 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) 61.4 ml ddH ₂ O
Birnie II	1 ml 10% SDS 1 pellet NaOH 9 ml ddH ₂ O	T ₅₀ NAOAc ₁₀₀ E ₁	6.25 2 M Tris (pH 8.0) 8.3 ml 3 M NaCH ₃ COO ⁻ 0.5 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) 234.92 ml ddH ₂ O
Birnie III	81.6g Na CH ₃ COO ⁻ 70 ml Glacial Acetic Acid 50 ml ddH ₂ O pH 4.8	Z Solution	16.1g Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O 5.5g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 0.75g KCl 0.246g MgSO ₄ 2.7 ml B-mercaeptanolo 1000 ml ddH ₂ O pH 7
80% Glycerol	80ml Glycerol 20 ml ddH ₂ O	Gus Stop Solution	4.24g Na ₂ CO ₃ 100 ml ddH ₂ O
X-Gal Stop Solution	10.6g Na ₂ CO ₃ 100 ml ddH ₂ O	0.1 M NaPO ₄	57.7 ml 1M Na ₂ HPO ₄ 42.3 ml 1M NaH ₂ PO ₄ 800 ml ddH ₂ O pH 7 Volume finale 1000 ml
Gus Assay Buffer	50 ml 0.1 M NaPO ₄ 10 ml 50 mM DTT 100 µl 0.5 M EDTA 625 µl 100 mM PNPG 39 ml ddH ₂ O		

Tabelle 2.4: Soluzioni

P. aureofaciens 30-84 e i ceppi mutanti da esso derivati. Tutti i ceppi di *E. coli* e *P. aureofaciens* sono stati crioconservati in una sospensione di glicerolo all'80% a -80°C , mentre gli isolati batterici identificati durante il corso del lavoro sono stati conservati in una sospensione di glicerolo al 30% a -20°C . Le soluzioni utilizzate nel prosieguo del lavoro sono riportate nella tabella 2.4.

3. Isolamenti batterici

Gli isolati batterici identificati durante il corso del lavoro sono derivati da isolamenti effettuati da diversi aereali della regione Campania e da diverse origini, come riportato nella seguente tabella (Tab. 2.5):

Anno	Luoghi	Origini
2001	Portici (NA)	carpoforo di <i>Alnicola solecina</i>
2001	Portici (NA)	carpoforo di <i>Auricularia auricularia</i>
2001	Portici (NA)	rizosfera di <i>Brassica rapa</i> subsp. <i>sylvestris</i>
2001	Portici (NA)	rizosfera di <i>Rosmarinus officinalis</i>
2001	Pontecagnano (SA)	rizosfera di <i>Lycopersicon esculentum</i>
2001	Pontecagnano (SA)	Suolo indisturbato
2001	Pontecagnano (SA)	rizosfera di <i>Phaseolus vulgaris</i>
2002	Grottaminarda (BN)	rizosfera di <i>Nicotiana tabacum</i>
2002	Cava De Tirreni (SA)	Paglia
2002	Napoli	Anticrittogamico biologico commerciale

Tab. 2.5 Campioni utilizzati per isolamenti batterici

Il protocollo d'isolamento è stato differenziato a seconda della tipologia di campioni. Al fine di ottenere isolati batterici di origine rizosferica, le radici sono state preventivamente ripulite dal terreno in eccesso mediante scuotimento o leggera spazzolatura; sono stati pesati 5 grammi di radici dello stesso campione che sono stati sminuzzati e posti in agitazione in 45 ml di acqua sterile per circa un'ora. La sospensione è stata diluita serialmente e aliquote sono state strisciate sul substrato agarizzato non selettivo NAG con un'ansa sterile in modo da ottenere colonie batteriche isolate.

La stessa procedura è stata seguita anche per gli isolamenti dai carpofori dei funghi spontanei e dalla paglia utilizzata come substrato di crescita per l'allevamento di *Pleurotus*.

L'anticrittogamico biologico commerciale, in formulato polverulento, è stato prima solubilizzato, secondo le indicazioni riportate sulla confezione, e quindi diluito scalarmente ed insemenzato su substrati solidi.

Le capsule Petri sono state poste in termostato a 28°C per 24/48 ore. Le colonie batteriche sono state selezionate in base alla morfologia e singolarmente trasferite su nuove piastre di NAG per la purificazione. Nel caso di colonie miste, queste sono state nuovamente purificate, sospendendole in 5 ml di soluzione fisiologica e poste in agitazione per circa un'ora e strisciate su NAG.

4. Identificazione degli isolati batterici

4A. Caratterizzazione preliminare

Di tutti gli isolati ottenuti sono stati osservati e registrati i caratteri fenotipici: forma, consistenza, colore, regolarità delle colonie permettono un'analisi morfologica completa (Foto 2.1). In seguito, ogni isolato è stato sottoposto al test del KOH (Suslow *et al.* 1982). Il metodo può sostituire la tecnica di colorazione Gram e ha il vantaggio di essere più rapido e altrettanto attendibile. Tramite un'ansa si preleva un'aliquota della colonia batterica; la si stempera, con movimento rapido e circolare, in una goccia di KOH, concentrato al 3%, posta su un vetrino, preventivamente sgrassato. Se sollevando l'ansa si nota la formazione di un sottile filamento mucoso si ritiene il test positivo e il batterio è considerato Gram negativo; nel caso di assenza di filamento, il test è negativo e il batterio Gram positivo. Tutti gli isolati risultati negativi al test, e perciò Gram positivi, sono stati esclusi dalle analisi successive dato che lo scopo di questo lavoro di tesi era quello di reperire batteri appartenenti al genere *Pseudomonas*.

Altro saggio preliminare e fondamentale nell'identificazione di specie batteriche è quello che permette l'accertamento della produzione di ossidasi. Poche gocce di un colorante, L'NNN (N-tetrametilfenilendiamina diidrocloreidrata) all'1%, sono state poste su carta da filtro, tramite pipetta sterile. Una colonia batterica è stata prelevata e strisciata sulla carta da filtro imbibita con il reagente. L'NNN, incolore allo stato ridotto, viene, nel giro di 10-20 secondi, ossidato virando al viola intenso nelle specie ossidasi-positive; la reazione è negativa se la colonia rimane incolore o del suo colore originario (Scortichini, 1995). Il controllo positivo utilizzato è stato

Pseudomonas fluorescens biovar I, biotipo A, ceppo LMG 5916. Gli pseudomonadi fluorescenti oggetto di questo studio sono tutti ossidasi positive.

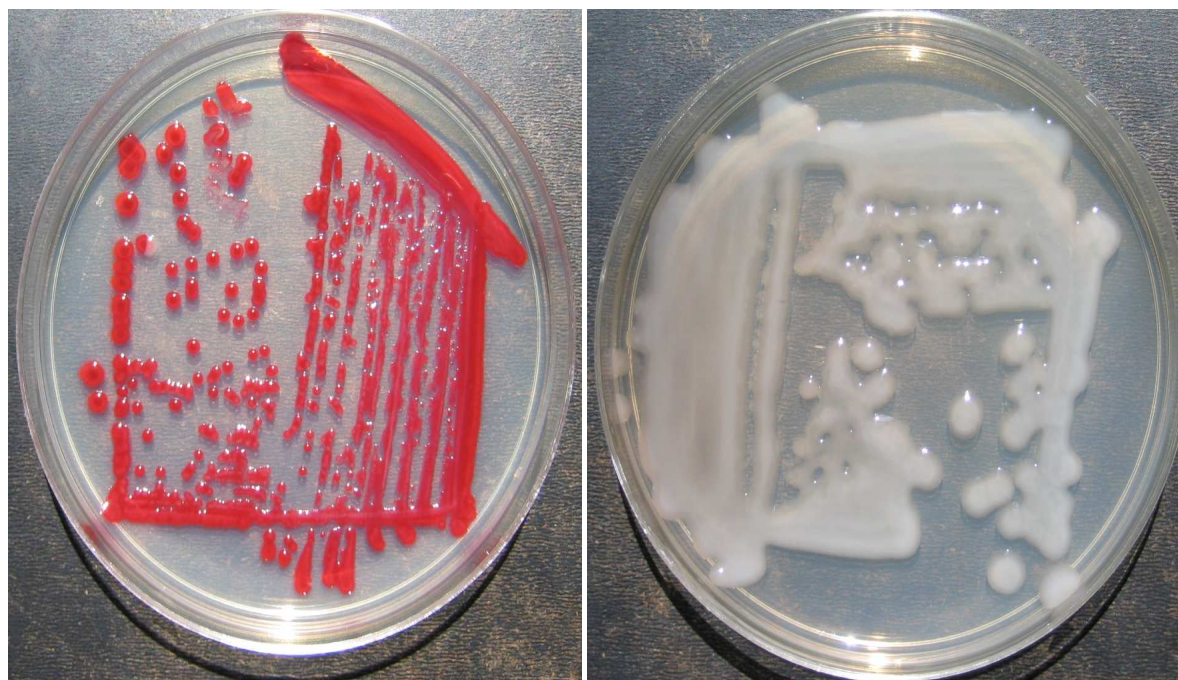


Foto 2.1 Fenotipi differenti osservati su piaster di NAG. Morfologia *Serratia*-like sulla sinistra dell'immagine mentre sulla destra è mostrata una morfologia *Pseudomonas*- like right.

4B. Test biochimici classici

Il “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” suggerisce una serie di prove, i cui risultati congiuntamente permettono di attribuire agli isolati batterici una prima collocazione tassonomica. I test che sono stati presi in considerazione sono: riduzione dei nitrati, produzione di arginina deidrolasi, idrolisi della gelatina, assimilazione di glucosio, arabinosio, mannosio, mannitolo, maltosio, gluconato, caprato, adirato, malato, citrato e fenil-acetato.

4C. Sistema API 20 NE

L’API (Analytical Profile Index) 20 NE (Foto 2.2) è un sistema standardizzato che unisce 8 test convenzionali a 12 test di assimilazione, per l’identificazione di batteri Gram-. Esso è composto di 20 “microtubi” contenenti terreni o substrati disidratati. I test convenzionali sono stati inseminati con una sospensione batterica in soluzione fisiologica, avente O.D.= 0,125, pari a 3×10^8 cfu/ml.

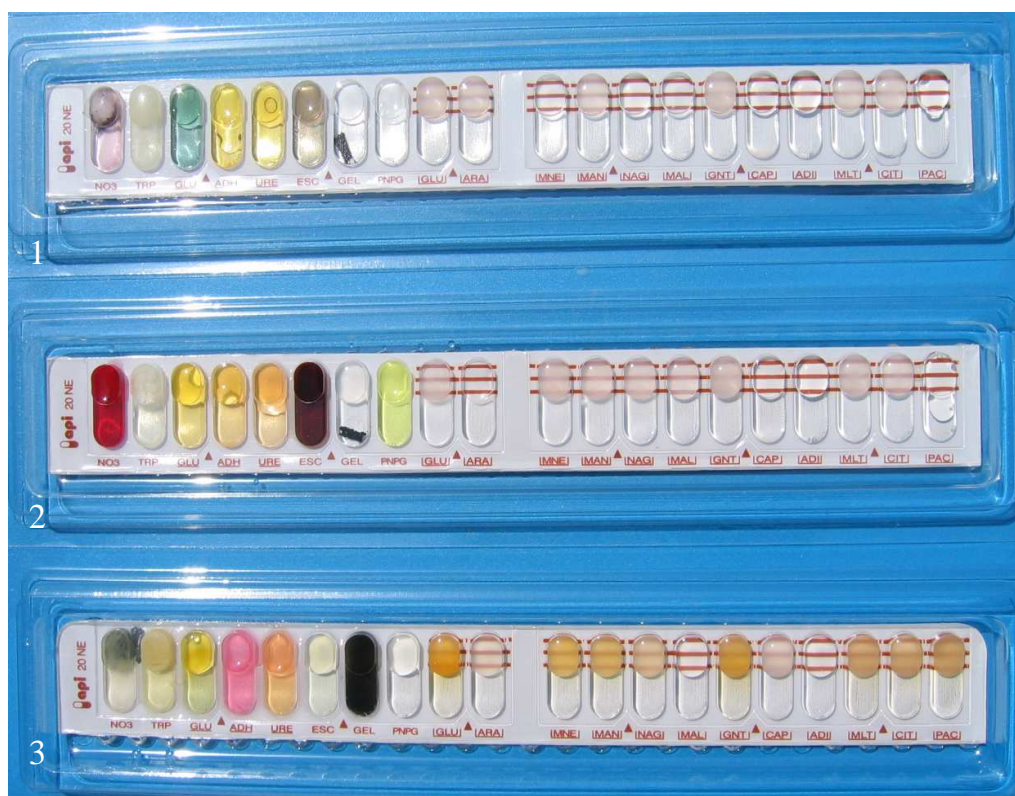


Foto 2.2 API 20 NE. 1: *Pseudomonas viridiflava* LMG 2352; 2: Mipaf 54; 3: Mipaf 71

Le reazioni metaboliche prodotte durante le 18/24 ore di incubazione a 30°C, sono state evidenziate tramite variazioni di colore spontanee o rilevabili dopo l'aggiunta di reattivi. I “microtubi” dei test di assimilazione, invece, sono stati insemnati con quantità minima di API Aux Medium, addizionato con 200 µl della sospensione batterica. In questo caso l'intorbidamento della sospensione è indice dell'utilizzazione del substrato, da parte degli isolati batterici.

L'identificazione può essere ottenuta con lo specifico Analytical Profile Index per il 20 NE, codificando l'insieme delle reazioni ottenute, ossia il profilo biochimico, in un profilo numerico. Sulla scheda di registrazione dei risultati, i test sono separati in gruppi di 3 ed un numero 1, 2 o 4 è indicato su ogni test. La raccolta, nell'ambito di ciascuna terna, della somma dei valori corrispondenti alle reazioni positive, fornirà un profilo numerico di 7 cifre che permetterà di risalire all'identificazione mediante confronto con il data-base del sistema.

4D. Test Biolog

Il metodo Biolog (Foto 2.3) permette l'identificazione delle specie microbiche attraverso la definizione di un profilo nutrizionale. Il test consiste nel saggiare contemporaneamente per ogni isolato batterico la capacità di utilizzare un'ampia gamma di composti organici come fonte di carbonio. Il sistema è costituito da una piastra a 96 pozzetti di cui 95 contengono differenti fonti di carbonio e uno che non ne contiene alcuna e che funge da controllo negativo.

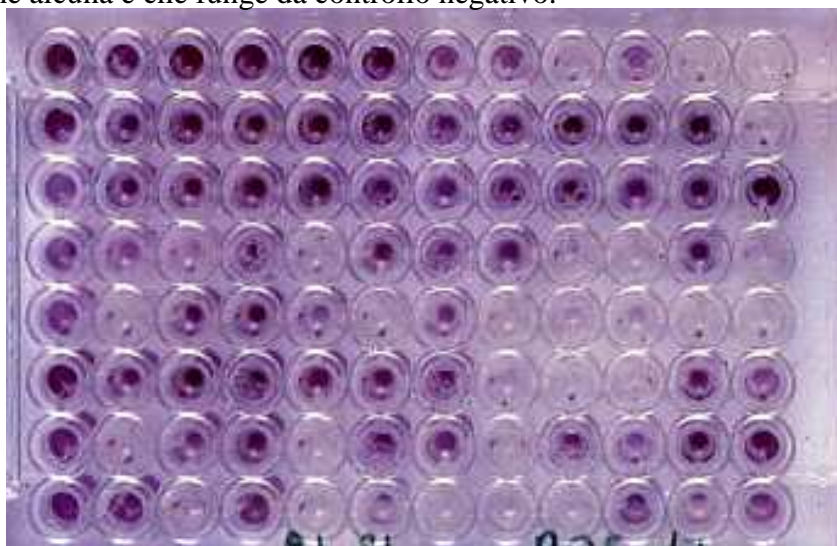


Foto 2.3 Piastra Biolog Test inocolata

Gli isolati sono stati incubati per 24 ore a 28°C in un incubatore termostato su mezzo agarizzato BUG (Biolog Universal Growth) e risospesi in tubi di vetro contenenti “GN/GP Inoculating fluid”.

La concentrazione batterica è stata poi corretta fino a raggiungere una densità ottica, letta a 560 nanometri, di 0.12 corrispondente a 3×10^8 cfu/ml.

I singoli pozzetti sono stati insemenzati con 150 µl di sospensione del batterio da identificare. Le piastre BIOLOG sono poi state incubate a 28°C per 24 ore. La prima lettura delle piastre è stata eseguita dopo 4 ore dall'inoculazione e la lettura definitiva dopo 24 ore. Il metodo è colorimetrico: l'assimilazione del composto provoca un aumento del tasso di respirazione che riduce l'indicatore (tetrazolio) presente nel pozzetto, facendolo virare al porpora. L'intensità di colorazione è stata comparata con il pozzetto A1 che funge da controllo negativo.

Tutti i pozzetti con colorazione simile a quella del pozzetto A1 sono stati considerati negativi, mentre quelli con evidente colorazione porpora sono stati valutati come risultati positivi. I pozzetti con colorazione poco marcata o con grumi di precipitato, sono stati ritenuti intermedi (+/-).

5. Protocolli per l'estrazione di plasmidi

Il kit Promega SV miniprep è stato utilizzato per l'estrazione plasmidica con il fine di ottenere una maggiore resa ed una maggiore grado di purezza del DNA destinato al sequenziamento. Nel corso del lavoro sono state utilizzati due differenti protocolli d'estrazione (5A e 5B) per verificare la presenza dei costrutti plasmidici in ceppi di *E. coli*. Il kit Promega SV miniprep è stato utilizzato per l'estrazione da *P. aureofaciens* 30-84, ma sono stati aggiunti diversi passaggi per poter ottenere una maggiore purezza del DNA estratto. Il Quiagen Dneasy^R Tissue Kit è stato utilizzato per l'estrazione del DNA genomico dagli isolate batterici pseudomonadi fluorescenti. Di seguito sono riportati i protocolli d'estrazione utilizzati:

5A. 100 ml Birnie Prep

- Allevare i batteri in 100 ml di LB addizionato con l'antibiotico specifico per garantire il mantenimento del plasmide, per 16-18 ore in agitatore termostato a 37°C.
- Riportare le colture batteriche in contenitori da 250 ml e successivamente centrifugare ad una velocità di 6000 rpm a temperatura ambiente per 8 minuti.
- Lasciare asciugare il precipitato
- Risospendere il pellet utilizzando 4 ml della soluzione Birnie1 e trasferire il tutto in tubi da 50 ml e riporre su ghiaccio per 30 minuti.
- Aggiungere 8 ml della soluzione Birnie 2. Miscelare gentilmente e lasciare su ghiaccio per 10 minuti.
- Aggiungere 6 ml della soluzione Birnie 3. Agitare i tubi e riporre su ghiaccio per 30-60 minuti.
- Centrifugare a 12000 rpm a 4°C per 20 minuti. Versare il supernatante in nuovi tubi da 50ml utilizzando imbuto e carta da filtro allo scopo di separare eventuali impurità.
- Aggiungere un eguale volume d'isopropanolo e lasciare su ghiaccio da 20 minuti ad alcune ore.
- Centrifugare a 7000 rpm a 4°C per 10 minuti.

- Risospendere il precipitato in 2 ml di T₅₀ E₁OAc₁₀₀ e trasferire in tubi di 10ml PP2059.
- Aggiungere 20 µl di Rnase e tenere a 37° C per 30 minuti.
- Aggiungere 2 ml di fenolo e lasciare in agitazione per 20 minuti.
- Aggiungere 2 ml di cloroformio e lasciare in agitazione per 20 minuti.
- Centrifugare alla massima velocità per 5 minuti.
- Trasferire la fase acquosa in un nuovo tubo ed aggiungere 2 ml di cloroformio e agitare per 20 minuti e centrifugare a massima velocità per 5 minuti.
- Trasferire la fase acquosa in un nuovo tubo ed aggiungere 200 µl di 3M NaOAc e 2 ml di isopropanolo e lasciare su ghiaccio per 20 minuti.
- Centrifugare a 7000 rpm a 4°C per 5 minuti.
- Lasciare asciugare il precipitato e risospendere in 500µl di T₁₀E₁ e trasferire in un eppendorf da 1.5 ml.
- Lasciare per 10 minuti ad una temperatura di 65° C.
- Conservare il prodotto d'estrazione ad una temperatura di 4°C.

5B. 5 ml Birnie Prep

- Allevare i batteri in 5 o 10 ml di LB addizionato con l'antibiotico specifico per garantire il mantenimento del plasmide, per 16-18 ore in agitatore termostato a 37°C.
- Centrifugare per 5 minuti a 4000 rpm utilizzando una centrifuga da banco.
- Lasciare asciugare il precipitato batterico e successivamente risospendere in 200 µl di Birnie 1 freddo.
- Trasferire la miscela in un eppendorf da 1.5 ml e lasciare su ghiaccio per 20 minuti.
- Aggiungere 400 µl di Birnie 2, miscelare gentilmente per 5 volte e lasciare su ghiaccio per 10 minuti
- Aggiungere 300 µl di Birnie 3, miscelare bruscamente e lasciare su ghiaccio per 30 minuti
- Centrifugare a 13000 rpm a temperatura ambiente per 10 minuti e riportare il supernatante in un nuovo eppendorf da 1.5 ml.
- Aggiungere 600 µl di isopropanolo e lasciare su ghiaccio da 20 minuti ad alcune ore.

- Centrifugare a 13000 rpm a temperatura ambiente per 10 minuti e lasciare asciugare il precipitato per alcuni minuti.
- Risospendere il precipitato in 300 µl di T₅₀ NaOAc₁₀₀ ed esporre ad una temperatura di 70°C per 5 minuti.
- Lasciare in agitazione per 20 minuti ad una temperatura di 37° C.
- Aggiungere 1ml d'etanolo 95% e lasciare su ghiaccio per 20 minuti.
- Centrifugare a 13000 rpm a temperatura ambiente per 10 minuti.
- Lasciare asciugare il precipitato per alcuni minuti e risospenderlo in 30 µl di T₁₀E₁
- Esporre ad una temperatura di 65° per 10 minuti
- Conservare il prodotto d'estrazione ad una temperatura di 4° C.

5C. Pseudomonas Plasmid Prep

- Allevare i batteri in 5 o 10 ml di LB addizionato con l'antibiotico specifico per garantire il mantenimento del plasmide, per 16-18 ore in agitatore termostato a 28° C.
- Centrifugare per 5 minuti ad una velocità di 4000 rpm utilizzando una centrifuga da banco.
- Eliminare il surnatante e risospendere il precipitato in 1ml di T₅₀E₅₀NaCl. Agitare su vortex per pochi secondi.
- Centrifugare per 5 minuti ad una velocità di 13000 rpm ed eliminare il surnatante.
- Eliminare il surnatante e risospendere il precipitato in 1ml di T₅₀E₅₀NaCl. Agitare su vortex per pochi secondi.
- Centrifugare per 5 minuti ad una velocità di 13000 rpm ed eliminare il surnatante.
- Usare il kit SV miniprep della promega partendo dal passaggio n°2
- Al momento del passaggio di eluizione previsto nel kit SV miniprep (Promega) utilizzare un volume di 100µl di acqua distillata sterile per eluire il DNA dalla colonna.
- Aggiustare il volume ad uno finale di 200µl utilizzando acqua distillata pura ed aggiungere 20µl di 3M NaCH₃COO⁻ e quindi, 220µl di isopropanolo.
- Lasciare su ghiaccio per 20 minuti o a -20°C per tutta la notte.
- Centrifugare i tubi eppendorf per 15 minuti ad una velocità di 13000 rpm ed eliminare il surnatante.
- Lasciare asciugare i tubi a temperatura ambiente su carta Kimwipe.

- Risospendere il DNA precipitato in un volume di 10 o 35µl di T₁₀E₁ a seconda della concentrazione finale desiderata.
- Conservare il DNA ottenuto a 4°C.

6. Manipolazione del DNA

6A. Enzimi

Nel corso del lavoro sono stati utilizzati diversi enzimi prodotti dalle ditte Invitrogen e Fermentas ed il loro uso ha seguito le indicazioni fornite dalle rispettive case produttrici. Il EZ-Tn5™ <Kan-2>Insertion Kit, prodotto dall' Epicentre, è stato utilizzato per la mutagenesi di una regione genomica di *P. aureofaciens* 30-84, seguendo le indicazioni fornite dalla suddetta casa produttrice.

6B. Trasformazione ceppi batterici

Il trasferimento di vettori in *Escherichia coli* DH5α è stato effettuato mediante l'uso della seguente procedura:

1. Aggiungere 100 o 200 µl di cellule competenti in un eppendorf da 1.5 ml.
2. Aggiungere miscela di ligazione contenenti DNA esogeno da trasferire.
3. Lasciare su ghiaccio per 60 minuti.
4. Tenere per 90 secondi a 42° C.
5. Inoculare 1 ml di LB liquido con il contenuto di un singolo eppendorf.
6. Lasciare in agitazione a 37°C per un'ora.
7. Riportare in eppendorf e centrifugare per un minuto.
8. Eliminare il surnatante e risospendere in un volume di 100 µl di H₂O bidistillata (ddH₂O) ed insemnare le piastre contenenti l'antibiotico specifico per garantire la selezione delle colonie trasformate.

6C. Trasformazione di *P. aureofaciens* 30-84

Nel momento in cui i plasmidi sono stati trasferiti nei ceppi di *Pseudomonas aureofaciens* 3084, si è eseguita la procedura denominata Triparental Mating che consiste in:

Primo Giorno

- Inoculare *E. coli* DH5 α con il vettore e l'inserto da essere mobilizzato (ceppo donatore) 3 ml di LB addizionati con l'antibiotico specifico.
- Inoculare 3 ml LB+ Km⁵⁰ con *E. coli* HB101 (ceppo helper).
- Inoculare 3 ml LB con *P. aureofaciens* 30-84 o suoi ceppi derivati (ceppo ricevente).

I batteri sono stati allevati per 16-18 ore in agitatore termostato alle T° specifiche per le diverse specie.

Secondo Giorno

- Lasciar asciugare le piastre Petri di LB senza antibiotico sotto cappa a flusso laminare.
- Trasferire filtri di nitrocellulosa sterile sulle piastre asciutte utilizzando pinze sterili.
- Trasferire 1 ml di coltura batterica in eppendorf da 1.5 ml e centrifugare per 1 minuto a 13000 rpm in una centrifuga da banco.
- Eliminare il supernatante e risospendere i pellets in 200 μ l di LB.
-
- Inoculare i filtri con 20 μ l del ceppo donatore, ricevente ed helper come illustrato nella figura 2.1. E' consigliabile utilizzare il substrato LB+PABA nel momento in cui il ceppo *P. aureofaciens* 30-84 o un ceppo mutante produttore di fenazine costituisce il ceppo ricevente.
- Incubare le piastre a 28°C per 24-48 ore

Terzo Giorno

- Trasferire i filtri di nitrocellulosa in tubi di vetro sterili e contrassegnati con la rispettiva sigla.
- Aggiungere 2 ml di ddH₂O sterile e agitare su vortex per pochi secondi per risospendere le cellule dai filtri.
- Inseminare 100 μ l in piastre di LB agar con il rispettivo antibiotico ed incubare a 28°C. La visualizzazione delle prime colonie può richiedere dalle 24 alle 72 ore. Le

piastre insemenate con i filtri “Solo Ricevente ” e “Solo Donatore” non devono presentare crescita di colonie.

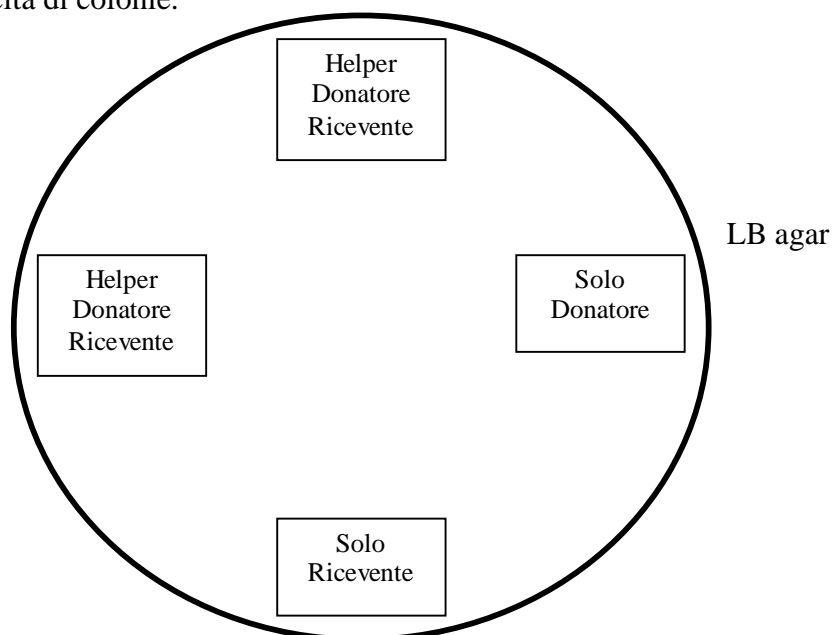


Fig.2.1 Triparental Mating. Disposizione dei filtri su piastra di LB

7. Reazioni di amplificazione

Tutti i primer utilizzati nel corso del lavoro sono riportati nella tabella 2.6. Tutti i primers forward utilizzati durante il lavoro posseggono un sito *EcoRI* (GAATTC) alla loro estremità 5' mentre tutti i primers reverse posseggono un sito di taglio per l'enzima *BamHI* (GGATCC) all'estremità 5'. L'aggiunta di tali siti di taglio ha facilitato la clonazione degli ampliconi che sono stati prodotti nel corso del presente studio.

Sigla	Sequenza nucleotidica	Ref.
fPs	5'-GGT CTG AGA GGA TGA TCA GT-3'	14
rPs	5'-TTA GCT CCA CCT CGC GGC-3'	14
fD1	5'-CCG AAT TCG TCG ACA ACA AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	15
rD1	5'-CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA AGC CC-3'	15
PphzF1	5'-CGA ATT CCA TAG ACG GCT TCG CGC TA-3'	Questo studio
PphzR1	5'-CGG GAT CCC TTA GTT GGG GGT GAT AGT GTT G-3'	Questo studio
PphzR2	5'-CGG GAT CCC TGA GTG GGT GTT GTT TAT ACA CCT-3'	Questo studio
PphzF2	5'-CGA ATT CAG CCA GCC CGC TCA TGC-3'	Questo studio
PphzF3	5'-CGA ATT CTC TGG TAG TTC CAC CCC CAA G-3'	Questo studio
lexAf	5'-CGG AAT TCA TCG AGA ATG CGT TCA ACG-3'	Questo studio
lexAr	5'- CGG GAT CCC TCA GTT CCC TGA GGA TGG-3'	Questo studio
psrAf	5'-CGG AAT TCA CAA GTG TTT GTC AGG CGG-3'	Questo studio
psrAr	5'-CGG GAT CCC TAG CTT AGC GGA TGT AAG CTG-3'	Questo studio

Tab. 2.6 Inneschi utilizzati nel corso del lavoro

7A. Primers Ps

La coppia di primers denominata Ps, disegnata da Widmer *et al.*, 1998, rende possibile discriminare l'appartenenza al gruppo *Pseudomonas* “*sensu stricto*” mediante l'amplificazione di un frammento di 990 bp della regione genomica codificante per la subunità 16 ribosomale di tutte le specie afferenti al gruppo batterico sopracitato. Tale coppia di inneschi è stata utilizzata per una identificazione degli isolati batterici aventi una morfologia riconducibile al gruppo delle pseudomonadi fluorescenti.

Le reazioni d'amplificazione sono state eseguite in un volume finale di 50 µl, utilizzando la miscela di reazione qui riportata (Tab. 2.7):

Reagenti	Concentrazione finale
PCR Buffer (10X)	1 X
MgCl ₂ (15 mM)	1.5 mM
dNTPs (10 mM)	20 µM ciascun nucleotide
rPs (10 mM)	0.1 µM
fPs (10 mM)	0.1 µM
Taq polimerase (5U/ml)	2.5 U
ddH ₂ O	Giungere a volume

Tab. 2.7 Miscela di reazione con primer Ps.

I cicli termici secondo cui si è svolta la reazione hanno previsto un'iniziale denaturazione del DNA a 95°C per 5', seguita dalla ripetizione di 35 cicli a 94°C per 1' (denaturazione), 58°C per 1' (appaiamento), 72°C per 2' (estensione) e quindi, un'estensione finale a 72°C per 4'. I prodotti d'amplificazione sono stati visualizzati su un gel d'agarosio all'1% colorati con una soluzione di bromuro d'etidio 1mg/ml. Invitrogen 1Kb plus è stato utilizzato quale marcatore di peso molecolare durante le corse elettroforetiche.

7B. Primers DI

I ceppi risultati afferenti al gruppo degli pseudomonadi fluorescenti sulla base di almeno uno dei due test fenotipici (API o Biolog) e che sono risultati positivi alla PCR *Pseudomonas* specifica, sono stati successivamente analizzati mediante PCR-RFLP della regione 16S dell'r-DNA allo scopo di verificare, tramite analisi molecolare, l'attendibilità dei risultati ottenuti. La PCR è stata impiegata per ottenere l'amplificazione di una regione

di dimensioni pari a 1550 bp, altamente conservata in tutti i batteri Gram-, utilizzando gli inneschi D1 designati da Weisburg *et. al* 1991. L'amplificazione è stata ottenuta in un volume finale di 50 µl, utilizzando la miscela di reazione con la seguente composizione:

Reagenti	Concentrazione finale
PCR Buffer (10X)	1X
MgCl ₂ (15 mM)	1.5 mM
dNTPs (10 mM)	20 µM ciascun nucleotide
rD1 (10 mM)	0.1 µM
fD1 (10 mM)	0.1 µM
Taq polimerase (5U/ml)	2.5 U
ddH ₂ O	Giungere a volume

Tab. 2.8 Miscela di reazione con primer D1.

I cicli termici secondo cui si è svolta la reazione hanno previsto un'iniziale denaturazione del DNA a 95°C per 3', seguita dalla ripetizione di 35 cicli a 94°C per 1'(denaturazione), 55°C per 1'(appaiamento), 72°C per 2'(estensione) e quindi, un'estensione finale a 72°C per 3'(16). Il profilo termico è stato affinato aumentando la temperatura d'appaiamento a 60°C al fine di operare in condizioni di maggiore stringenza. Le amplificazioni sono state compiute utilizzando l'apparecchiatura MASTERCYCLER personal della Eppendorf.

I risultati sono stati visualizzati tramite corsa elettroforetica orizzontale su gel d'agarosio all'1.5% (wt/vol.) addizionato con una soluzione d'etidio bromuro 1 mg/l. Per ogni pozzetto sono stati caricati 5 µl d'amplificato. Il marker utilizzato è stato il 1 Kb Plus (Invitrogen). La corsa è stata eseguita a 90 volt per 45 minuti e il gel è stato immediatamente fotografato, esponendolo ad una sorgente di raggi UV, su Polaroid tipo 665.

Dieci microlitri degli amplificati corrispondenti alla dimensione della sequenza di 1550 bp sono stati digeriti, per un'ora, in un volume finale di 25 µl in un

bagnetto termostato a 37°C. Per la digestione sono state utilizzate 5 U delle endonucleasi considerati più discriminanti nell'ambito del genere *Pseudomonas* (La guerre *et al.*,1994). Gli enzimi impiegati sono stati: *Alu* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Mse* I ed *Rsa* I. I frammenti di restrizione sono stati separati mediante elettroforesi orizzontale a 80 v per 3 ore e fotografati. Per la determinazione delle dimensioni dei frammenti è stato usato il marker 123 bp (Invitrogen).

I diversi profili di restrizione sono stati confrontati visivamente con quelli ottenuti dai ceppi di riferimento per un'accurata determinazione della specie e/o biovar di *Pseudomonas*.

7C. Primers Pphz

Gli inneschi contraddistinti con l'acronimo Pphz sono stati disegnati per subclonare diverse regioni del potenziale promotore dell'operone delle fenazine. Gli inneschi Pphz F1R1 e F1R2 sono stati disegnati utilizzando il website dell'Invitrogen ed il loro uso ha permesso l'ottenimento dell'amplificazione di due frammenti di 356 e 245 bp rispettivamente.

L'amplificazione dei suddetti prodotti di amplificazione è stata ottenuta utilizzando la miscela di reazione ed i profili di termici riportati nella seguente tabella (Tab. 2.9):

Reagenti	Concentrazione finale	Cicli PCR	
PCR Buffer (10X)	1X	Denaturazione iniziale	94°C 4 min
MgCl ₂ (15 mM)	1.5 mM	Denaturazione	94°C 30 sec
dNTPs (10 mM)	0.2 mM		
PphzF1 (10 mM)	0.2 mM	Appaiamento e allungamento	72°C 1 min
PphzR1 (10 mM)	0.2 mM		
Taq Polymerase (5U/ml)	1.5 U	Allungamento finale	72°C 5 min
ddH ₂ O			

Reagenti	Concentrazione finale	Cicli PCR	
PCR Buffer (10X)	1X	Denaturazione iniziale	94°C 4 min
MgCl ₂ (15 mM)	1.5 mM	Denaturazione	94°C 30 sec
dNTPs (10 mM)	0.2 mM		
PphzF1 (10 mM)	0.2 mM	Appaiamento e allungamento	72°C 1 min
PphzR2 (10 mM)	0.2 mM		
Taq Polymerase (5U/ml)	1.5 U	Allungamento finale	72°C 5 min
ddH ₂ O			

Tab. 2.9 Miscela di reazione e profili termici utilizzati con le combinazioni di primers PphzF1/R1 e PphzF1/R2

I passaggi di denaturazione, di appaiamento e di estensione sono stati ripetuti per trenta volte. Date le temperature di fusione dei tre primers utilizzati, i cicli di annealing ed estensione sono stati accorpati in una unica esposizione a 72°C in entrambe le reazioni di amplificazione. Tutte le PCR sono state effettuate utilizzando l'apparecchiatura Eppendorf Mastercycler Gradient Thermocycler.

Tre microlitri dei prodotti di amplificazione sono stati caricati e lasciati migrare su gel di agarosio all'1.3%, onde verificare la dimensione dei prodotti; in seguito i prodotti di amplificazione sono stati eluiti e purificati dal gel utilizzando il Quiagen's QIAQuick Gel Extraction Kit, eseguendo i passaggi indicati dalla casa produttrice. Il DNA ottenuto dall'eluizione è stato digerito con gli enzimi *EcoRI/BamHI* per poter trasferire i diversi frammenti di DNA nei siti *EcoRI/BamHI* del plasmide reporter pKT2-lacZ.

Le coppie di primers Pphz F2R1 e F3R2 sono state disegnate usando il website della Invitrogen, ed il loro uso ha permesso l'amplificazione di due frammenti rispettivamente di 184 e 164 bp. La miscela di reazione ed i cicli termici, riportati nella tabella seguente (Tab. 2.10), hanno consentito l'ottenimento delle amplificazioni delle regioni desiderate:

Reagenti	Concentrazione finale	Cicli PCR	
PCR Buffer (10X)	1X	Denaturazione iniziale	94°C 4 min
MgCl ₂ (15 mM)	1.5 mM		
dNTPs (10 mM)	0.2 mM	Denaturazione	94°C 30 sec
PphzF1 (10 mM)	0.2 mM	Appaiamento	66°C 1 min
PphzR2 (10 mM)	0.2 mM	Allungamento	72°C 2 min
Taq Polymerase (5U/ml)	1.5 U		
ddH ₂ O		Allungamento finale	72°C 5 min

Tab. 2.10 Miscela di reazione e cicli utilizzati con le coppie di primer PphzF2/R1 e PphzF3/R1

7D. Inneschi *lexA* e *psrA*

Le coppie di primers *psrA* e *lexA* presentavano temperature di fusione simili, pertanto è stato possibile effettuare reazioni di amplificazioni aventi le stesse miscele di reazione e gli stessi profili termici (Tab. 2.11). Tutte le reazioni di amplificazioni sono state effettuate utilizzando il termociclature Eppendorf Mastercycler Gradient Thermocycler.

Reagenti	Concentrazione finale	Cicli PCR	
PCR Buffer (10X)	1X	Denaturazione iniziale	94°C 4 min
MgCl ₂ (15 mM)	1.5 mM		
dNTPs (10 mM)	0.2 mM	Denaturazione	94°C 30 sec
Primer forward (10 mM)	0.2 mM	Appaiamento	66°C 1 min
Primer reverse (10 mM)	0.2 mM	Allungamento	72°C 1 min
Taq Polymerase (5U/ml)	1.5 U		
ddH ₂ O		Allungamento finale	72°C 5 min

Tab. 2.11 Miscela di reazione utilizzata con i primer *lexA* e *psrA*.

I prodotti di amplificazione (848bp per *psrA* e 1000 bp per *lexA*) sono stati visualizzati su gel di agarosio allo 0.7%. Le bande sono state eluite e purificate utilizzando il Quiagen's QIAQuick Gel Ectraction Kit, ed il DNA è stato successivamente digerito con gli enzimi *EcoRI/BamHI* onde permettere il trasferimento di tali prodotti di amplificazione nei vettori pPR510 e pLAFR3 digeriti con gli stessi enzimi di restrizione.

8. Sequenziamento ed analisi del DNA

Tutti I prodotti di amplificazione riportati nei paragrafi 7.C e 7.D e tutti I frammenti di DNA derivanti dall'analisi di una regione genomica di *P. aureofaciens* 30-84 sono stati inviati al DNA Sequencing Facility dell'University of Arizona (Tucson, AZ) dove sono stati sequenziati mediante l'uso dell'Applied Biosystems 777 Automated DNA Sequencer. I risultati dei diversi sequenziamenti svolti sono stati elaborati attraverso l'uso del software di pubblico accesso <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> NCBI nucleotide-nucleotide BLAST

9. Saggio della B-galattosidasi

1. Inseminare il ceppo da saggiare in 3 ml di LB addizionato dell'antibiotico specifico e lasciare in agitazione per 16-18 ore a 28°C.
2. Rilevare il valore della OD₆₂₀ della coltura batterica.
3. Prelevare 500 µl della coltura batterica e riportare in un nuovo tubo di vetro.
4. Aggiungere 500 µl della soluzione Z (Tab.2.4).
5. Aggiungere 2 gocce di cloroformio per ogni tubo, agitare su vortex e lasciare decantare per 5 minuti a temperatura ambiente.

6. Aggiungere 200 µl di ONPG (4mg/ml) e annotare il tempo di inizio della reazione.
7. Aggiungere 500 µl di una soluzione 1 M di Na₂CO₃ nel momento in cui si raggiunge il punto di viraggio (la soluzione passa da un colore bianco ad un giallo intenso).
8. Agitare su vortex per 10 secondi e rilevare il tempo in cui è stato aggiunto un volume di una soluzione 1 M di carbonato di sodio.
9. Rilevare i valori di OD415 ed OD540.
10. Calcolare il valore delle unità di B-galattosidasi prodotte, utilizzando la seguente formula.

$$1000 \times [(OD415 - 1.75 \times OD540) / (t \times V \times OD620)]$$

in cui t indica il periodo di tempo che va dall'aggiunta della soluzione Z all'aggiunta del volume della soluzione 1 M di Na₂CO₃, mentre V indica il volume della coltura batterica utilizzata durante il saggio.

10. Saggio GUS

I saggi per valutare l'attività del gene reporter *uidA* sono stati effettuati utilizzando un protocollo derivante da una riformulazione della procedura messa a punto da Gallagher et al, 1992 (18):

1. Per quanto concerne i ceppi mutanti e lo stesso ceppo wild type di *P. aureofaciens* 30-84, inoculare 3ml di LB addizionato con antibiotico per permettere il mantenimento del plasmide reporter e lasciare in agitazione per 16-18 ore a 28°C.
2. Inoculare 3ml di LB addizionato con antibiotico con 30 µl della coltura batterica
3. Incubare a 28°C finchè la sospensione batterica non raggiunga una densità pari ad un valore OD620 che si attesti tra lo 0.4 e lo 0.5
4. Durante la crescita batterica è opportuno preparare un tubo di vetro contenente 800 µl del Gus Assay Buffer ed un tubo di vetro contenente 800 µl di Gus Stop Solution per ogni campione saggiato.

5. Trasferire 1.5 ml della coltura batterica in tubi eppendorf sterili da 2 ml e centrifugare per un minuto alla massima velocità e quindi raccogliere le cellule. Eliminare immediatamente il surnatante.
6. Risospendere le cellule in 1 ml di LB con l'antibiotico e centrifugare di nuovo per un minuto a 13000 rpm. Ripetere due volte questo passaggio.
7. Valutare l'OD620. Le cellule possono essere conservate a -70°C se non sono immediatamente saggiate.
8. Riscaldare i tubi contenenti il Gus Assay Buffer in un bagnetto termostato a 37°C .
9. Rendere permeabili le cellule contenute nel tubo eppendorf aggiungendo due gocce di cloroformio ed agitare immediatamente su vortex per 10 secondi.
10. Aggiungere un volume di 200 μl della sospensione batterica ai tubi contenenti il Gus Assay Buffer, ed agitare su vortex per pochi secondi. Riporre i tubi nel bagnetto termostato a 37°C .
11. Rimuovere 100 μl della reazione ed aggiungerlo ai tubi contenenti 800 μl di Gus Stop Solution nel momento in cui il Gus Assay Buffer assume una colorazione giallo intenso.
12. Misurare il valore OD405 e calcolare l'attività glucoronidasica, altrimenti detta GUS, utilizzando la seguente formula:

$$\text{GUS activity} = \text{OD405} / (\text{OD620}) (V) (t) (0.02)$$

Il valore t indica il periodo di tempo intercorso tra i passaggi 10 ed 11, mentre il valore V indica il volume della coltura batterica utilizzata per valutare l'attività glucoronidasica.

11. Estrazione delle fenazine

Le estrazioni delle fenazine sono state eseguite seguendo i passaggi descritti da Pierson et al (1992):

1. Inseminare 10 ml di substrato liquido (LB, M9 o PPMD) con il ceppo da saggiare e lasciare in agitazione per 16-18 ore.
2. Riportare la coltura batterica in un falcon da 50 ml e centrifugare per 10 minuti ad una velocità di 10.000 rpm a temperatura ambiente
3. Aggiungere 2 gocce di una soluzione 12N HCl ed agitare brevemente su vortex

4. Aggiungere un volume di 10 ml di benzene
5. Lasciare in agitazione a temperatura ambiente per due ore ad una velocità di 50 rpm.
6. Centrifugare per 5 minuti ad una velocità di 5000 rpm a temperatura ambiente
7. Trasferire il supernatante in tubi di polipropilene.
8. Lasciare evaporare a temperatura ambiente sotto cappa chimica (24-48h)
9. Aggiungere 1 ml di 0.1N NaOH e risospendere il precipitato
10. Lasciare in agitazione per 20 minuti a temperatura ambiente
11. Misurare il valore OD₃₆₇ come indice della produzione totale di fenazine
12. Lo spettro UV-visibile deve essere valutato attraverso “wavelength scanning” per verificare i valori raggiunti a 367 e 484 nm, rispettivamente, valori indicativi degli anelli caratterizzanti le fenazine e del gruppo ossidrilico della 2-idrossifenazina (2OHPCA).

12. Prove di antagonismo *in vitro*

Trenta isolati afferenti al gruppo degli pseudomonadi sono stati saggiati per verificarne l'attività di antibiosi *in vitro* nei confronti di alcuni funghi fitopatogeni terricoli, quali *Phytophthora ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. s. *lycopersici*, e contro *Botrytis cinerea*, patogeno ubiquitario e altamente polifago.

Cento µl di una sospensione batterica con concentrazione pari a 3×10^8 cfu/ml sono stati inseminati in piastre contenenti il substrato agarizzato PDA e sono state incubate per 24 ore a 28°C. Al termine di questo periodo, sulla stessa piastra Petri, sono stati adagiati dei dischetti di agar, di 0.5 cm di diametro, prelevati al margine delle colonie fungine allevate su PDA. Solo *Fusarium*, che ha un indice di accrescimento in piastra più ridotto rispetto agli altri miceti, è stato inseminato in piastra contemporaneamente ai batteri. La prova è stata replicata 3 volte, saggiando 2 isolati batterici per ogni piastra. Gli aloni di inibizione di accrescimento del micelio fungino sono stati visualizzati dopo 2-3 giorni.

13. Produzione di siderofori

Per evidenziare in maniera più netta l'effetto della produzione di queste molecole, sono stati utilizzati 2 diversi protocolli:

13.a Protocollo A

I substrati utilizzati sono stati il King's B addizionato o meno con FeCl_2 10 mM. Per ciascuna piastra sono stati saggiati 4 isolati batterici insemenzati in modo da ottenere delle macrocolonie. Sul substrato King's B, la comparsa di un alone fluorescente intorno alle macrocolonie, evidenziabile ai raggi UV, indicava la produzione di siderofori.

Poiché i siderofori sono prodotti in carenza di ioni Fe^{3+} , l'assenza di fluorescenza sul substrato addizionato con FeCl_2 , conferma la sintesi di questo tipo di sostanze da parte degli isolati batterici. Come controllo positivo è stato utilizzato il ceppo LMG 5916, *Pseudomonas fluorescens* biovar I.

13.b Protocollo B

Si è ritenuto opportuno verificare i risultati ottenuti applicando protocollo precedente avvalendosi anche di una seconda tecnica detta comunemente del doppio strato. I substrati utilizzati sono stati gli stessi descritti per il protocollo A. Sono state preparate delle sospensioni batteriche a concentrazione di 1×10^8 cfu/ml e, per ogni isolato, sono stati insemenzati 50 μl , in modo da ottenere delle macrocolonie. Le capsule Petri sono state poste ad incubare per 24 ore a 28°C .

Trascorso questo periodo di incubazione, le macrocolonie sono state devitalizzate utilizzando dischetti di carta bibula imbevuti di cloroformio, adagiati nel coperchio della piastra. Esse sono state chiuse, capovolte e, dopo un'ora, sono state aperte e lasciate arieggiare, per circa 10 minuti, sotto cappa a flusso laminare.

Ceppi di *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Rhodococcus fascians*, *Xantomonas campestris* ed *Agrobacterium tumefaciens*, sono stati allevati, per 48 ore a 28°C , in tubi contenenti LB (Liquid Broth). Le colture sono state miscelate con 4 ml di tampone fosfato all'1%, agarizzato, precedentemente disciolto, e versate sulle piastre contenenti gli isolati, devitalizzati di *Pseudomonas*, da saggiare. Il secondo strato di agar è stato lasciato solidificare e successivamente le capsule sono state incubate per 24-48 ore a 28°C e osservate.

Gli isolati produttori di siderofori evidenziavano la formazione di aloni di inibizione nei confronti delle diverse specie batteriche fitopatogene saggate.

14. Attività chitinolitica

La chitina è una dei componenti fondamentali della parete cellulare fungina; uno dei meccanismi di antibiosi messo in atto dai batteri antagonisti consiste nella degradazione della chitina per opera di enzimi litici specifici, quali le chitinasi. Quattro isolati batterici per piastra sono stati strisciati su capsule Petri contenenti il substrato agarizzato MM (Minimal Medium) addizionato con chitina purificata, in modo da formare delle macrocolonie. Le piastre sono state poste ad incubare a 28°C per 24 ore.

L'MM è un substrato salino per cui gli isolati produttori di chitinasi erano in grado di utilizzare la chitina come fonte nutritiva. L'avvenuta degradazione è stata visualizzata con la formazione di un alone di chiarificazione del substrato, normalmente di colore bianco opaco, intorno alla macrocolonia. Un ceppo di *Serratia marcescens* e uno di *Bacillus cereus* produttori di chitinasi sono stati utilizzati come controlli positivi.

15. Produzione di acido cianidrico ed attività proteasica.

L'attività proteasica è stata valutata mediante l'inoculazione di piastre di Skim Milk agar con 100 µl di una sospensione batterica di densità pari a 1×10^7 cfu/ml ed una successiva incubazione a 28°C per 24-48 ore. *P. aureofaciens* 30-84 wild type è stato utilizzato come controllo positivo mentre il ceppo mutante *P. aureofaciens* 30-84 W, mancante della proteina GacA funzionale ed incapace nel produrre proteasi, è stato utilizzato quale controllo negativo.

L'indicatore Cyantesmo cianide prodotto dalla Macherey-Nagel (Germania) è stato utilizzato per poter valutare la produzione di acido cianidrico. Striscie di 8 cm del sopracitato indicatore è stato fissato all'interno delle piastre Petri inoculate con i batteri da testare. La valutazione della produzione di HCN è stata effettuata mediante la valutazione del viraggio di colore dell'indicatore da verde chiaro a blu intenso, dopo una incubazione a 28° overnight.

16. Prove di antagonismo *in vivo*

Sono stati saggiati in prove di biocontrollo “in vivo” gli isolati MIPAF 9 (*Enterobacter aerogenes*) e MIPAF 26 (*Pseudomonas fluorescens*), che sono risultati tra gli antagonisti più attivi *in vitro*. Nelle prove è stato incluso anche per il ceppo MIPAF 13, un batterio Gram positivo, ossidasi negativo e con morfologia delle colonie tipica del genere *Bacillus*, identificato al BIOLOG test come *Bacillus mycoides*. I batteri prescelti sono stati testati contro *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* su piantine di circa 2 settimane di *Lycopersicon esculentum* cv. Marmande e contro *Rhizoctonia solani* su piantine di circa 1 mese di *Nicotiana tabacum* var. Barley. Le piantine sono state batterizzate mediante annaffiatura con sospensioni batteriche di 1×10^8 cfu/ml, dopo una settimana si è proceduto all'inoculazione con le sospensioni dei patogeni (1×10^9 frammenti di ife/ml). Gli antagonisti sono stati impiegati da soli o associati, allo scopo di individuare eventuali combinazioni sinergiche, secondo lo schema seguente:

- 1) P= *P. fluorescens* Mipaf 26
- 2) B= *B. cereus* Mipaf 13
- 3) E= *E. aerogenes* Mipaf 18
- 4) P+B
- 5) P+E
- 6) E+B
- 7) P+B+E
- 8) Pt non batterizzate
- 9) Batterio non antagonista (*E. coli*)

La prova è stata condotta secondo uno schema a blocco randomizzato con tre replicazioni. I rilievi sono stati effettuati due volte: il primo a distanza di 7 e il secondo a distanza di 15 giorni dall'inoculazione dei patogeni.

Capitolo III

Risultati-Parte I

1. Identificazione degli isolati batterici

Gli isolamenti effettuati da diverse matrici hanno consentito di ottenere una collezione di 112 isolati batterici. Nella tabella 3.1.1 è riportato il numero complessivo di isolati ottenuto da ciascun tipo di campione.

Campione d'origine	Luogo	N° Isolati
carpofo di <i>Alnicola solecina</i>	Napoli	9
carpofo di <i>Auricularia auricularia</i>	Napoli	10
rizosfera di <i>Brassica rapa</i> subsp. <i>sylvestris</i>	Napoli	14
rizosfera di <i>Rosmarinus officinalis</i>	Napoli	13
rizosfera di <i>Lycopersicon esculentum</i>	Napoli	3
Suolo indisturbato	Salerno	21
rizosfera di <i>Phaseolus vulgaris</i>	Salerno	22
rizosfera di <i>Nicotiana tabacum</i>	Benevento	15
Paglia	Salerno	1
Anticrittogamico biologico commerciale	Napoli	4
Totale		112

Tab. 3.1.1. Origine e ripartizione degli isolati batterici

I caratteri morfologici delle colonie sono stati osservati e registrati così da costituire dei gruppi in cui tali parametri potessero essere considerati omogenei. I risultati sono riportati in tabella 3.1.2.

<u>Numero di isolati</u>	<u>Forma</u>	<u>Consistenza</u>	<u>Colore</u>
2	Colonie circolari, a margine intero, leggermente rilevate	Mucose	Bianco perla
33	Colonie irregolari, a margine variamente frastagliato, piatte	Compatta. Le colonie di alcuni giorni possono formare pellicole opache	Bianco
75	Colonie circolari, a margine intero, trasparenti, piatte	Compatta	Variabile dal bianco, al paglierino, all'arancione, al blu
2	Colonie circolari, a margine intero, rilevate	Mucose	Rosso rubino

Tab. 3.1.2 Descrizione delle colonie isolate

I 75 isolati del terzo gruppo, che sono risultati morfologicamente assimilabili al gruppo degli pseudomonadi, sono stati successivamente sottoposti al test del KOH (test sostitutivo della reazione di Gram) e a quello dell'ossidasi (Tab. 3.1.3):

K O H e test dell'ossidasi	
I s o l a t i b a t t e r i c i	Q u a n t i t à
G r a m + / O s s i d a s i +	3
G r a m - / O s s i d a s i -	6
G r a m + / O s s i d a s i -	6
G r a m - / O s s i d a s i +	60
T o t a l e	75

Tab. 3.1.3 Suddivisione degli isolati in gruppi in base ai risultati ottenuti dal test dell'ossidasi e del KOH

Un gruppo rappresentativo di 30 isolati dei 60 con morfologia *Pseudomonas*-simile, Gram negativi e ossidasi positivi sono stati scelti e saggiati ai test API 20 NE e BIOLOG per l'identificazione. Inoltre una collocazione tassonomica è stata attribuita anche facendo ricorso ai test classici riportati nel "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (1995). I risultati ottenuti con i tre metodi sono messi a confronto nella tabella 3.1. 4.

Il profilo biochimico, ottenuto dall'analisi API 20 NE, e quello d'assimilazione, registrato con il sistema BIOLOG, sono stati elaborati in modo da permettere un confronto delle differenze tra i nostri isolati. E' possibile, infatti, esprimere numericamente le distanze tassonomiche tra gli organismi basandosi sul numero di caratteri comuni rispetto al totale dei caratteri esaminati.

Il coefficiente di similarità, che tiene conto solo delle coppie positive di caratteri dei due organismi e non di quelle negative, è fondamentale per questo tipo d'analisi. Esso è calcolato nel seguente modo:

$$S = a / a + b + c$$

dove

a = numero di caratteri positivi per entrambi i ceppi

b = numero di caratteri positivi nel ceppo 1 e negativi nel ceppo 2

c = numero di caratteri positivi nel ceppo 2 e negativi nel ceppo 1

Sigla Isolato	BIOLOG	API 20 NE	Bergey's Manual
AF1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> bio ¹ A	<i>P. fluorescens</i> I ²	<i>P. fluorescens</i> I
MIPAF 9	<i>Pseudomonas</i> group II	<i>P. fluorescens</i> III	<i>P. fluorescens</i> III
MIPAF 17	<i>Pseudomonas fluorescens</i> bio G	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I
MIPAF 19	<i>Pseudomonas fluorescens</i> bio G	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> III
MIPAF 20	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I
MIPAF 22	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I
MIPAF 24	<i>Pseudomonas fluorescens</i> bio G	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I
MIPAF 26	<i>Pseudomonas fluorescens</i> bio F	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I
MIPAF 45	<i>Pseudomonas fluorescens</i> bio F	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> II
MIPAF 49	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	No ID	<i>P. fluorescens</i> II
MIPAF 50	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> II
MIPAF 51	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	No ID	<i>P. fluorescens</i> II
MIPAF 52	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	No ID	<i>P. fluorescens</i> II
MIPAF 54	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	No ID	<i>P. fluorescens</i> II
MIPAF 62	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>
MIPAF 71	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	No ID	<i>P. aureofaciens</i>
MIPAF 72	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>
MIPAF 73	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	No ID	<i>P. aureofaciens</i>
MIPAF 80	<i>Pseudomonas fluorescens</i> bio F	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> V
MIPAF 88	<i>Pseudomonas fulva</i>	No ID	<i>P. fulva</i>
MIPAF 109	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	No ID	<i>P. fluorescens</i> V
MIPAF 114	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I
MIPAF 115	<i>Pseudomonas viridilivida</i>	<i>P. testosteroni</i>	<i>P. putida</i>
MIPAF 116	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I
MIPAF 117	<i>Pseudomonas fluorescens</i> bio G	No ID	<i>P. fluorescens</i> I
MIPAF 118	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I
MIPAF 119	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> IV
MIPAF 120	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> IV
MIPAF 121	<i>Pseudomonas fluorescens</i> bio A	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> IV
MIPAF 122	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> IV
LMG 5916	<i>Pseudomonas fluorescens</i> bio A	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I
LMG 14674	<i>Pseudomonas fluorescens</i> bio C	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> III
LMG 5833	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> IV
LMG 14681	<i>Pseudomonas putida</i> bio B	<i>P. putida</i> I	<i>P. putida</i>
LMG 2352	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	No ID	<i>P. viridiflava</i>
LMG 2339	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	No ID	<i>P. tolaasii</i>

Tab. 3.1.4 Identificazione delle diverse specie e biovar batteriche per mezzo dei test biochimici e fisiologici.
¹=bio indica biotipo; ²=i numeri romani indicano la biovar.

I raggruppamenti evidenziati da questo tipo di analisi permettono di formulare una serie di considerazioni:

- Il sistema API 20 NE è preciso nell'identificazione delle specie.
- Il metodo non permette di distinguere tra le diverse biovar o biotipi di *P. fluorescens*.
- E' un sistema molto rapido, relativamente economico e di semplice attuazione.

Nel caso del metodo BIOLOG, la matrice binaria è stata elaborata sulla base della lettura di 2 piastre per ogni ceppo batterico secondo il seguente schema:

Lettura 1	Lettura 2
+	+
+	+/-
+/-	+/-
Lettura 1	Lettura 2
-	-
-	+/-
-	+

La lettura risultante è stata ritenuta positiva e nella matrice le è stato attribuito il valore 1.

La lettura risultante è stata ritenuta negativa e nella matrice le è stato attribuito il valore 0

Il dendrogramma ottenuto con questa seconda matrice è il seguente (Figura 3.1.2):

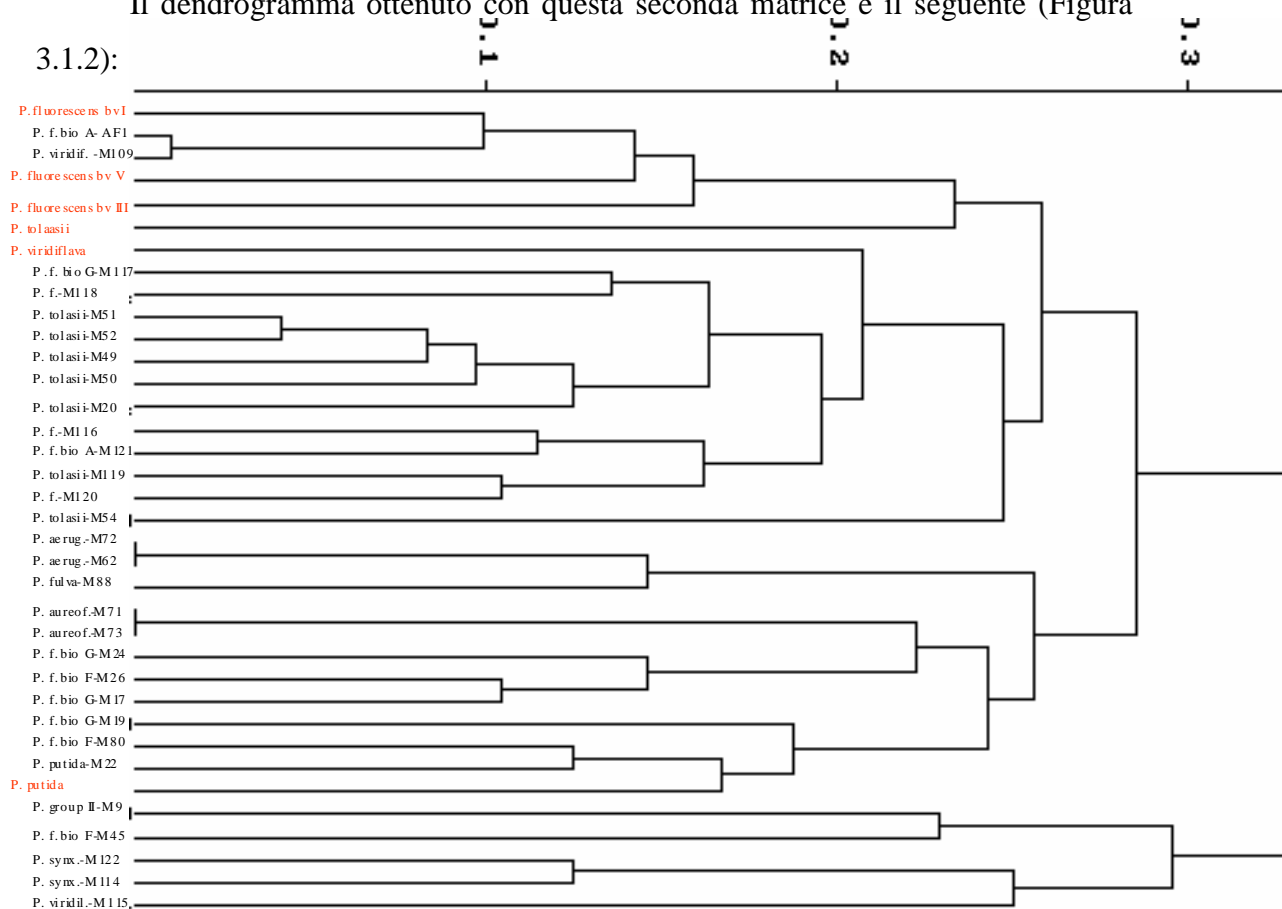


Fig 3.1.2 Raggruppamenti degli isolati in base all'analisi statistica dei dati forniti dal metodo BIOLOG. I ceppi di riferimento sono indicati in rosso.

I risultati, che possono essere letti con una certa difficoltà sul dendrogramma precedente, permettono di considerare che:

- I batteri non sono stati separati in cluster diversi in base alla specie o alla biovar e quindi l'analisi numerica, in questo caso, non è in grado di fornire indicazioni sull'afferenza dei ceppi di *Pseudomonas* della nostra collezione a determinate specie o biovar.
- La nomenclatura utilizzata dal metodo BIOLOG per il gruppo degli pseudomonadi fluorescenti non è univoca in quanto fa riferimento a diversi sistemi tassonomici.
- Tale sistema, in confronto al metodo API 20 NE, è più costoso e richiede una maggiore esperienza nella lettura dei risultati.
- Esso è comunque un metodo molto rapido e di semplice esecuzione.

Oltre ai metodi biochimici e fisiologici è stata compiuta l'analisi della regione DNA codificante per la subunità 16S ribosomiale allo scopo di ottenere una più precisa collocazione tassonomica delle specie in esame. La lettura dei diversi profili di restrizione (Foto 3.1.2) ha permesso di compilare una matrice con elementi caratteristici 1 e 0, in base alla presenza o assenza di un determinato frammento di restrizione.

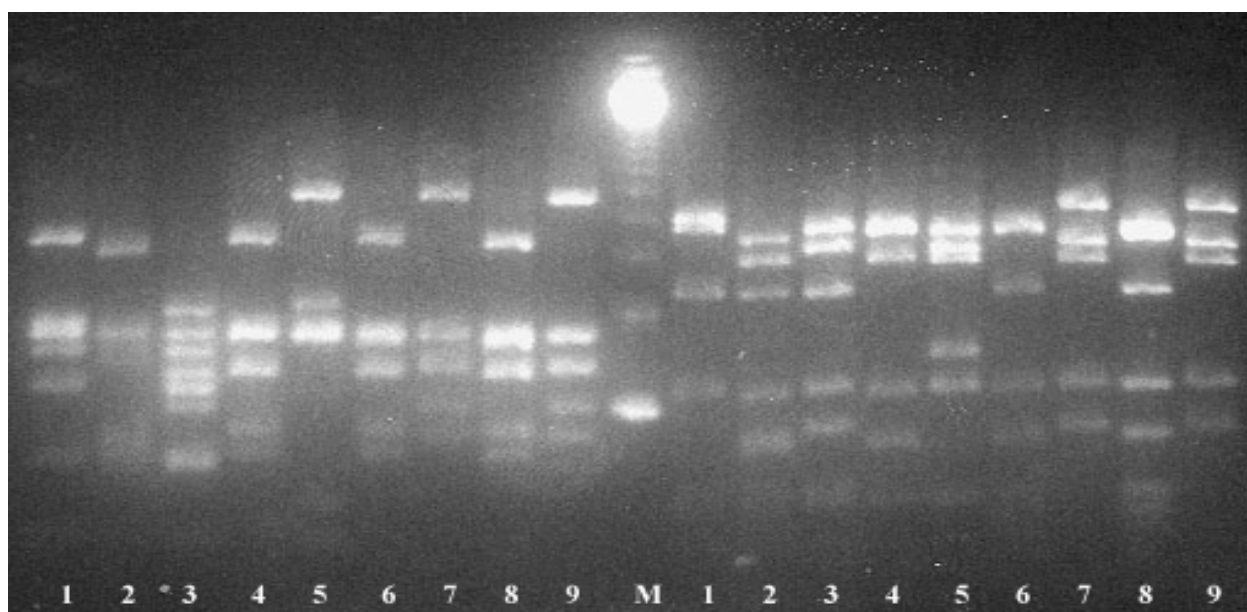


Foto 3.1.2 Profilo di restrizione ottenuto digerendo un frammento della regione 16-S r-DNA con gli enzimi *Alu* I (gruppo di sinistra) e *Rsa* I (gruppo di destra). 1=*P. fluorescens* biovar 1; 2=*P. fluorescens* biovar III; 3=*P. fluorescens* biovar V; 4=*P. putida*; 5=*P. viridiflava*; 6=*P. tolaasii*; 7=M109; 8=M80; 9=M26.

Il dendrogramma riportato nella figura 3.1.3 è stato ottenuto mediante l'elaborazione dei risultati della PCR-RFLP con il software Syntax. Tale dendrogramma in generale conferma i raggruppamenti evidenziati con il metodo API 20 NE. Alcune divergenze sono inevitabili considerato che nell'analisi dei frammenti di restrizione il numero di variabili considerate è minore di quelle analizzate con il test API 20 NE.

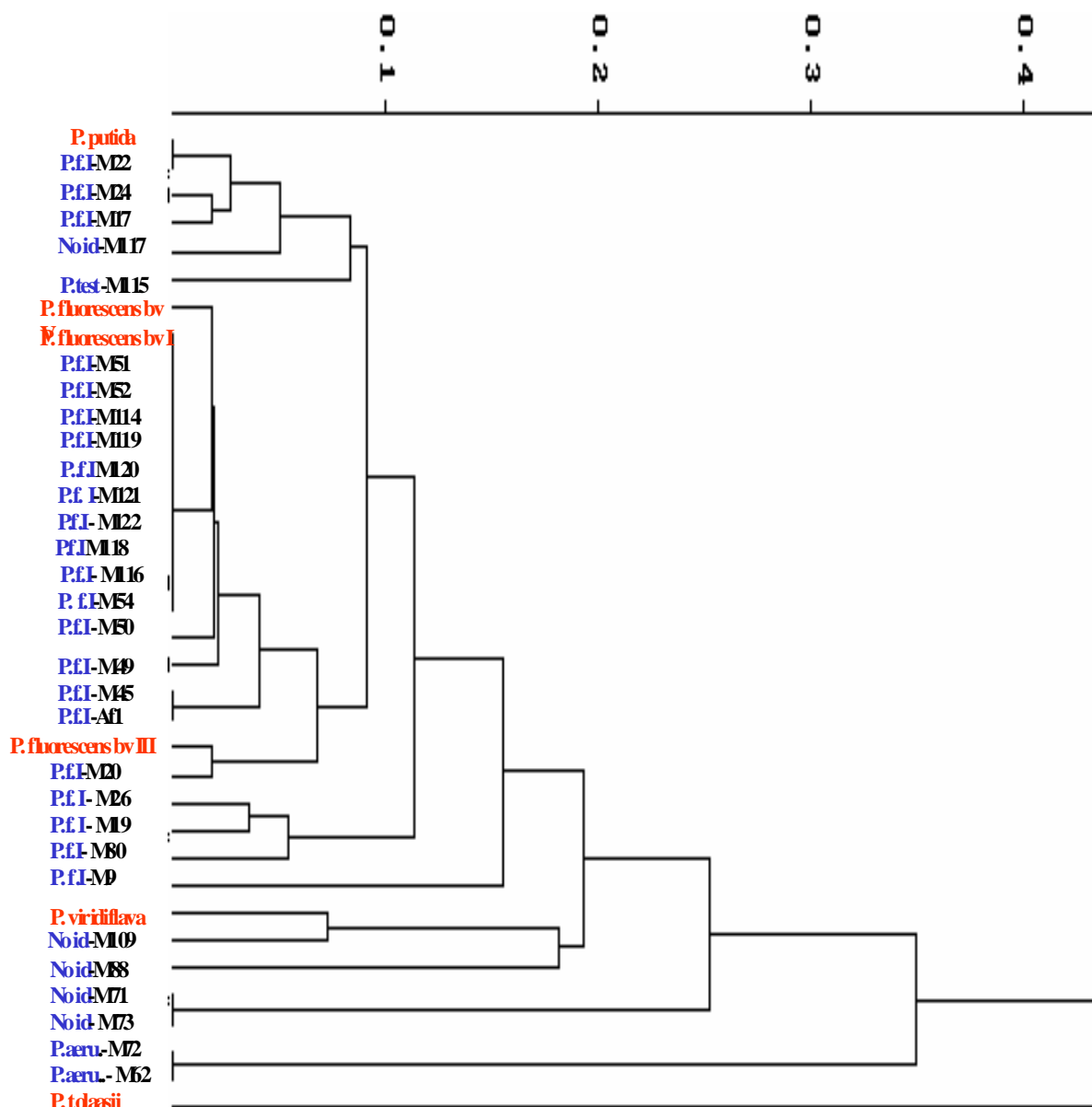


Figura 3.1.3: raggruppamenti degli isolati in base all'analisi statistica dei dati forniti dai profili di restrizione. I ceppi di riferimento sono indicati in rosso. Per confronto sono state inserite le identificazioni fornite dal sistema API 20 NE, indicate in blu: P.f.I=*P. fluorescens* biovar I; P.test.=*P. alcaligenes/testosteroni*; P.aeru.=*P. aeruginosa*; No id= Batterio non identificato

Tutti i 30 isolati analizzati sono inoltre risultati positivi alla PCR specifica per il genere *Pseudomonas* e questo ci ha permesso di attribuire con certezza tutti gli isolati al gruppo delle *Pseudomonas* “sensu stricto” (Foto3. 1.3).

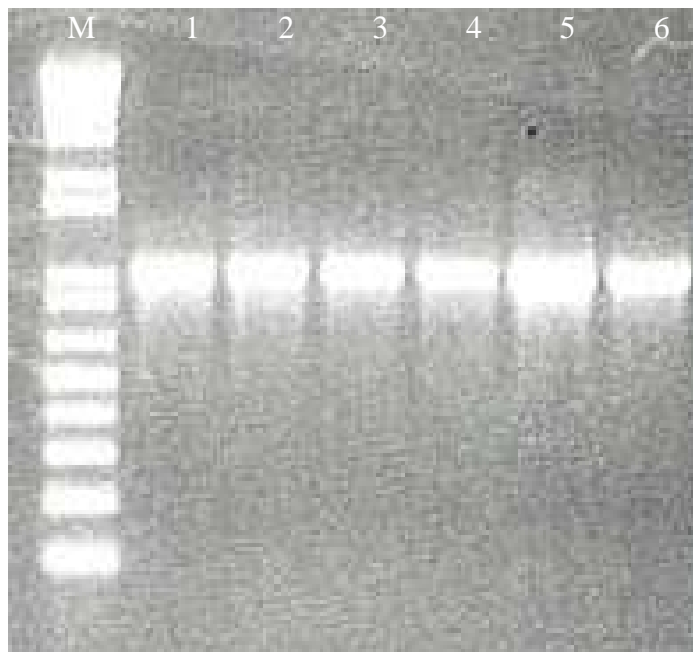


Foto3.1.3 :Prodotto di amplificazione ottenuto in seguito a PCR dell'intero DNA genomico di alcuni ceppi considerati. 1=Mipaf 45; 2=Mipaf 49; 3=Mipaf 50; 4=Mipaf 51;5=Mipaf 52; 6=Mipaf 62

2. Risultati saggi *in vitro*

Trenta ceppi, rappresentativi del gruppo degli isolati afferenti al genere *Pseudomonas*, sono stati saggiati *in vitro* per verificarne l'attività di antibiosi nei confronti di 4 funghi fitopatogeni: *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, , *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*. I saggi sono stati replicati tre volte per ogni isolato e per ogni fungo.

L'attività è stata espressa in funzione del numero delle replicazioni nelle quali il batterio ha dimostrato attività antagonistica (Tab. 3.15). Quando sono stati utilizzati come antagonisti i ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas aureofaciens*, i miceti hanno presentato accrescimento pionnotico, ossia scarsa produzione di micelio aereo associato a collasso delle ife e perdita della naturale pigmentazione.



Foto 3.1.4 Antibiosi dei ceppi saggiati in piastra contro il fungo fitopatogeno *Pythium ultimum*

Ceppo Batterico	<i>Botrytis</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Pythium</i>
Mipaf 9	---	+--	---	---
Mipaf 17	---	---	---	---
Mipaf 19	+++	---	+++	---
Mipaf 20	---	+--	---	---
Mipaf 22	++-	---	++-	---
Mipaf 24	+++	---	++-	---
Mipaf 26	++-	---	---	+++
Mipaf 45	---	---	---	---
Mipaf 49	---	---	---	---
Mipaf 50	---	---	---	---
Mipaf 51	---	---	---	---
Mipaf 52	---	---	---	---
Mipaf 54	---	---	---	---
Mipaf 62	+++	+++	+++	+++
Mipaf 71	+++	+++	+++	+++
Mipaf 72	+++	+++	+++	+++
Mipaf 73	+++	+++	+++	+++
Mipaf 80	---	+++	---	+++
Mipaf 88	---	+++	---	---
Mipaf 109	---	---	---	---
Mipaf 114	---	++-	---	++-
Mipaf 115	---	++-	---	++-
Mipaf 116	---	++-	---	++-
Mipaf 117	---	++-	---	++-
Mipaf 118	---	++-	---	++-
Mipaf 119	---	+++	---	++-
Mipaf 120	---	+++	---	+++
Mipaf 121	---	+++	---	+++
Mipaf 122	---	+++	---	+++
AF1	+++	---	+++	---

Tab. 3.1.5: Attività mostrata dai diversi ceppi nei confronti dei 4 funghi fitopatogeni testati. I segni positivi o negativi indicano la presenza o assenza della formazione di alone di inibizione. Più segni positivi o negativi indicano quante ripetizioni sul totale hanno fatto registrare lo stesso risultato.

Soltanto 23 dei 30 ceppi testati *in vitro* si sono mostrati attivi nei confronti dei funghi saggiati. Sette ceppi non hanno interferito minimamente con la crescita dei miceti, mentre otto hanno mostrato scarsa attività nei confronti di uno o due funghi. Sono stati scelti, quindi, i rimanenti 15 ceppi per eseguire studi su alcuni dei metaboliti da essi prodotti e coinvolti nell'attività di inibizione. La produzione di fluorescenza su King's B (Protocollo A) è indice dell'effettiva produzione di queste molecole trasportatrici degli ioni ferro e tale risultato è ulteriormente confermato quando l'alone fluorescente non risulti evidenziabile su King's B addizionato con FeCl_2 .

Nel caso del protocollo B (Materiali e Metodi par.13b) invece l'inibizione della crescita del batterio contenuto nel doppio strato di agar è indicativo della produzione di siderofori soltanto se esso si forma in condizioni di mancanza di ferro (King's B). L'assenza del detto alone, sul mezzo King's B addizionato con il ferro, conferma che l'attività di antibiosi è da imputare alla produzione dei siderofori. Nel nostro caso la formazione di aloni di inibizione anche sul substrato arricchito con ferro ci permette di ipotizzare che i ceppi esaminati producano anche altre sostanze inibitrici della crescita, probabilmente antibiotici.



Foto 3.1.5 Formazione di aloni di inibizione nei confronti di *Rhodococcus fascians* imputabili alla produzione di siderofori da parte dei ceppi testati

Nessuno dei ceppi saggiati ha evidenziato produzione di chitinasi, in quanto nessuno di essi è riuscito a degradare la chitina contenuta nel "Minimal Medium".

3. Risultati delle prove *in vivo*

L'attività antagonista mostrata dai ceppi batterici più reattivi *in vitro* è stata valutata anche con una prova di antagonismo *in vivo*. Soltanto un rappresentante del gruppo dei batteri caratterizzati è stato saggiato e confrontato con altri isolati della collezione raccolta durante questo studio, ma non afferenti al genere *Pseudomonas*. In particolare sono stati selezionati i ceppi *Bacillus spp.* Mipaf 13, *Enterobacter aerogenes* Mipaf 18 e *Pseudomonas fluorescens* Mipaf 26 (Materiali e Metodi par.16). I risultati di tali prove sono riportati in tabella 3.1.6

R.solani		F. o. lycopersici	
Trattamento	%*	Trattamento	%*
B	13.1 a	P+B	29.1 a
P+B	12.0 a	<i>F. o. lycopersici</i>	27.7 ab
<i>E. coli</i>	12.0 a	P+E	16.6 abc
<i>R.solani</i>	10.9 a	<i>E. coli</i>	12.0 abc
P+E	8.9 ab	P+B+E	7.6 bc
P+B+E	7.0 ab	E+B	7.4 bc
E+B	4.7 ab	P	3.3 c
E	4.1 ab	E	3.0 ab
P	0 b	B	0 c
H ₂ O	0 b	H ₂ O	0 c

Tab 3.1.6 Esiti delle prove di biocontrollo *in vivo*. *Incidenza di malattia calcolata come percentuale di piante infette. I valori seguiti da lettere uguali non sono significativamente differenti al Test di Duncan (P=0.05)

B= *Bacillus cereus* Mipaf 13; E= *Enterobacter aerogenes* Mipaf 18; P= *Pseudomonas fluorescens* Mipaf 26

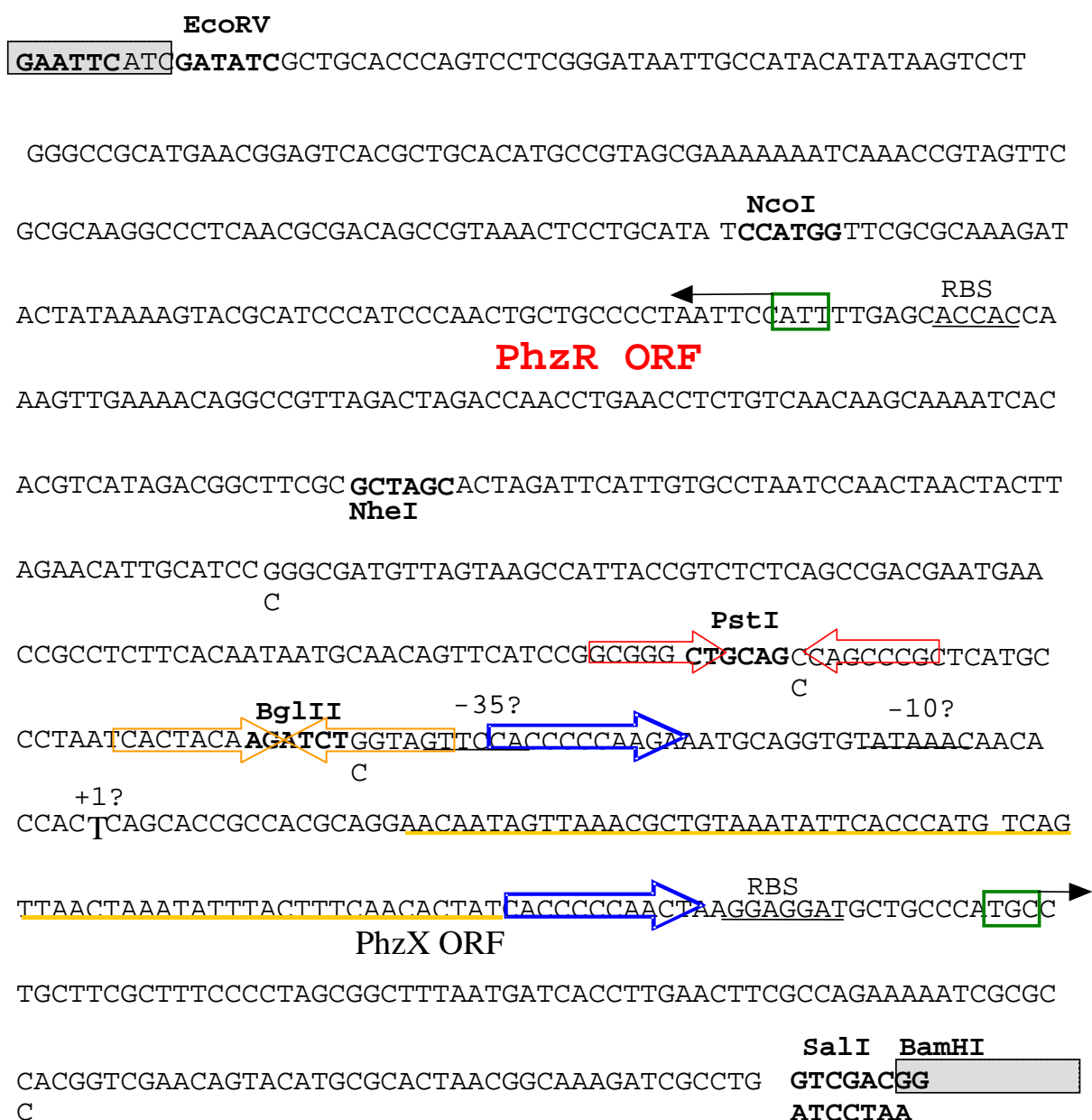
I risultati dei test *in vivo* contro la *Rhizoctonia solani* indicano che l'incidenza della malattia non è significativamente differente quando oltre al patogeno vengono inoculati anche il *Bacillus*, l'*Enterobacter*, o miscele dei tre batteri.

Capitolo III

Risultati-Parte II

1. Regione intergenica tra *phzR*-*phzX*

La regione localizzata fra *phzR* e *phzX* è stata analizzata nel corso di questo lavoro. Tale regione intergenica consta di circa 800 bp caratterizzate da diversi siti di restrizione, come riportato nella figura 3.2.1:



L'analisi della sequenza nucleotidica componente la regione sopraccitata ha permesso di identificare diverse caratteristiche che possono essere potenzialmente correlate all'attivazione dell'operone delle fenazine. Due regioni palindromiche sono state identificate a monte di una probabile posizione -35 (GTTCCA). La prima regione, denominata "PstI box" è centrata nel sito di restrizione di *PstI* (GCGGGCTGCAGCCAGCCCGC) nella posizione -93 dalla posizione $+1$ del gene *phzX*, mentre la seconda è centrata nel sito di taglio di *BglII* (CACTACAAGATCTGGTAGT) in posizione -60 . La seconda regione, denominata "BglII box", presenta un elevato grado di omologia con una regione palindromica caratterizzante alcuni promotori di geni controllati dal fenomeno del quorum sensing come illustrato nella tabella seguente (Tab. 3.2.1).

Specie batterica	Gene	Sequenza nucleotidica
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	<i>phzI</i>	CCCTACCAGATCTTGCAGGT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>lasB</i>	ACCTGCCAGTTCTGGCAGG-T
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>phzI</i>	CACTACAAGATCTGGTAGTT
<i>Vibrio fischeri</i>	<i>luxI</i>	AGCTGTAGGATGGTACAGG-T
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>traI</i>	AGGGTGCA-AATC-TGCACG-T

Tab. 3.2.1 Omologia tra promotori di geni controllati dal fenomeno del quorum sensing.

La regione nucleotidica frapposta tra due ripetizioni della sequenza CACCCCCAAGA, localizzata tra la posizione -33 e la posizione $+94$, presenta un'interessante alto contenuto di purine. È da aggiungere che tale regione ricca in AT non è presente nella regione promotore del gene *phzI*, in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84, gene anch'esso regolato dal quorum sensing, mentre tale regione è presente a monte dell'operone delle fenazine nel ceppo *P. fluorescens* 2-79.

2. Caratterizzazione della regione intergenica.

La regione intergenica è stata introdotta nel plasmide pLAF3, utilizzando diverse combinazioni di enzimi di restrizione onde poter evidenziare regioni *in cis* che possano svolgere un ruolo nell'attivazione dell'operone delle fenazine. I differenti frammenti di restrizione ed i plasmidi derivanti da essi sono elencati nella figura 3.2.2.

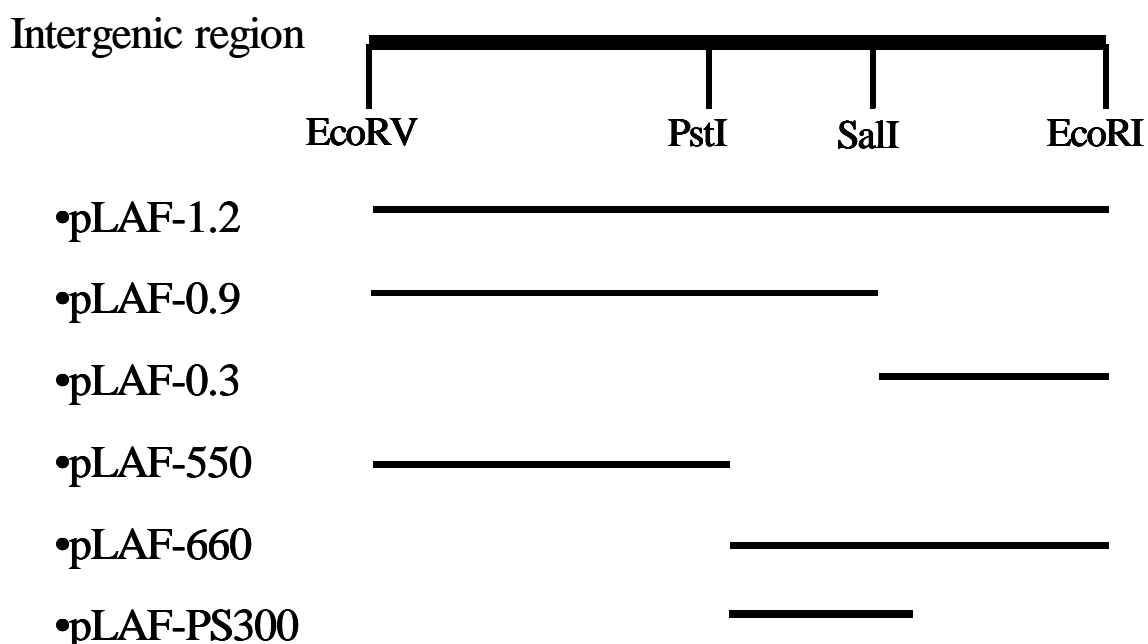
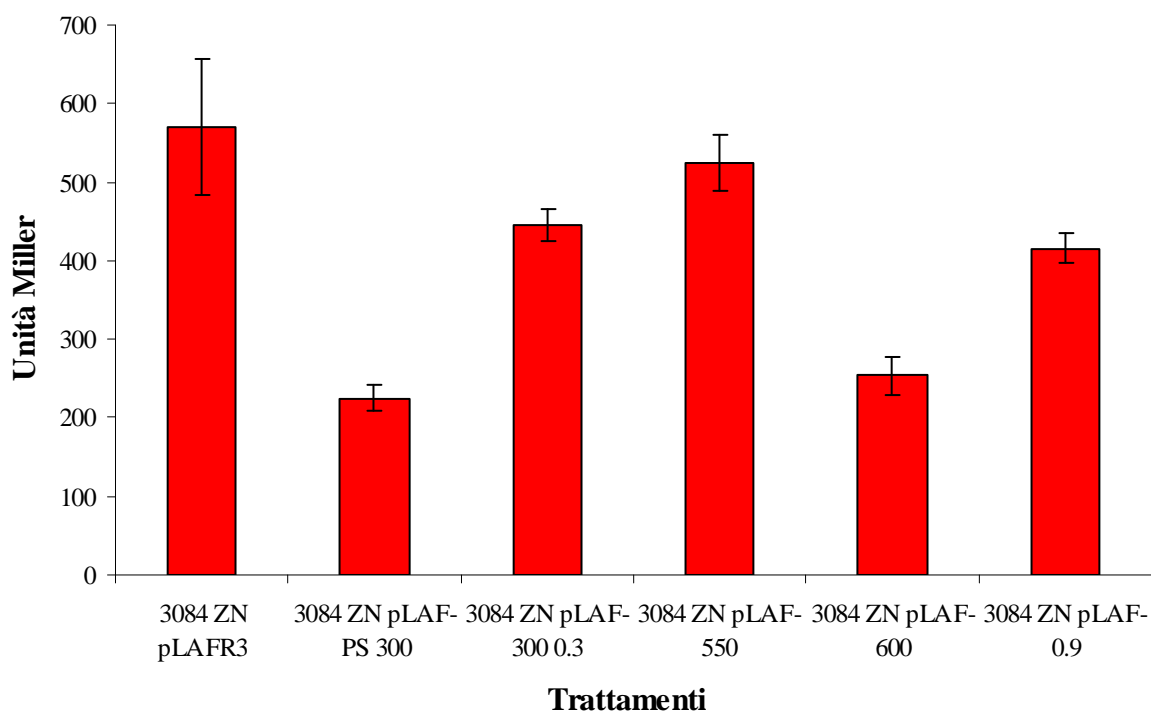


Fig. 3.2.2 Frammenti di restrizione derivanti dalla digestione della regione intergenica frapposta tra *phzR* e *phzX*

I diversi vettori sono stati trasferiti in trans nel ceppo competente *E. coli* DH5 α e quindi di seguito, sono stati mobilizzati nel ceppo reporter *P. aureofaciens* 30-84 ZN (*phzB::lacZ*) mediante il metodo del triparental mating. Successivamente sono stati effettuati test della B-galattosidasi per evidenziare l'influenza dei frammenti della regione intergenica su l'attività del gene *phzB*.

La regione intergenica, clonata nel cosmide pLAFR3 (cosmide pLAF0.9) non ha presentato alcuna influenza negativa sulla espressione del gene reporter *lacZ*, dato evidenziatosi anche nel caso in cui la regione legata al gene *phzR*, compresa tra i siti di restrizione *EcoRV* / *PstI*, è stata riportata in trans nel ceppo reporter *P. aureofaciens* 30-84 ZN.

La regione di 600 bp compresa tra i siti di restrizione riconosciuti dagli enzimi *PstI* ed *EcoRI* ha influenzato in modo negativo l'espressione di *phzB::lacZ*; pertanto, alla luce di tale dato (Tab. 3.2.2), sono state effettuate ulteriori analisi per evidenziare la regione adibita ad essere il promotore dell'operone delle fenazine.



Trattamenti	Unità Miller	Errore Standard
3084 ZN pLAFR3	570	87
3084 ZN pLAF-PS 300	225	17
3084 ZN pLAF-300 0.3	445	20
3084 ZN pLAF-550	525	36
3084 ZN pLAF-600	254	24
3084 ZN pLAF-0.9	416	19

Tab. 3.2.2 Risultati dei test della B-galattosidasi per la valutazione di diversi frammenti di restrizione della regione intergenica tra i geni *phzR* e *phzX*.

3. Prodotti di amplificazione

Un gene *lacZ* mancante di un proprio promotore è stato trasferito nel plasmide ad ampio spettro d'ospite pKT2, utilizzando il sito di restrizione *HindIII*, dando come risultato il vettore reporter pKT2-*lacZ*. Tale vettore, riportato nella figura 3.2.3, è stato utilizzato per valutare l'attività di diversi prodotti di amplificazione che sono ottenuti dall'uso di combinazioni di quattro inneschi. Gli oligonucleotidi sono stati disegnati sulla sequenza nucleotidica della regione intergenica di 900 bp analizzata nel corso del lavoro.

Di seguito sono riportati le caratteristiche dei diversi prodotti di amplificazione analizzati:

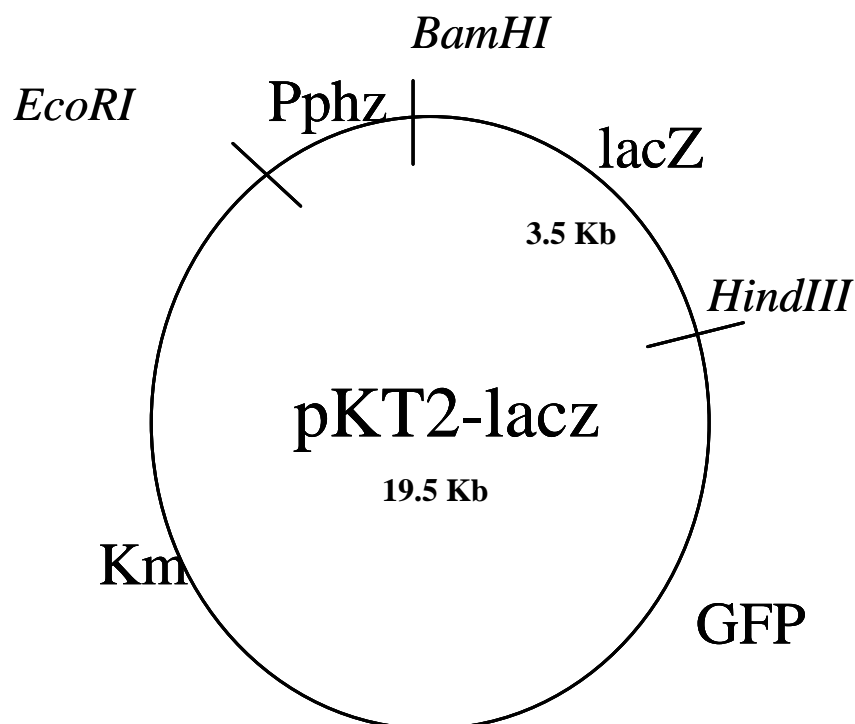


Fig. 3.23 Vettore reporter pKT2-*lacZ*

- Coppia di primer F1R1= Il prodotto di amplificazione è di 356 bp localizzata fra il sito di restrizione dell'enzima *NheI* e la sequenza Shine and Dalgarno (AGGAGG) del gene *phzX*; tale sequenza comprende le regioni palindromiche denominate “*PstI* box” e “*BglII* box”, e la regione con alto contenuto di purine compresa tra le due sequenze ripetute.
- Coppia di primer F1R2= Il prodotto di amplificazione è di 245 bp ed è localizzato fra il sito *NheI* e la posizione +1 del gene *phzX*. Tale prodotto di amplificazione è mancante della regione ricca in AT e comprende i “*PstI* box” e “*BglII* box” ed una delle due sequenze ripetute.
- Coppia di primer F2R1= Il prodotto di amplificazione è di 184 bp ed è localizzato fra il sito di restrizione di *PstI* e la sequenza di Shine e Dalgarno del gene *phzX*. Tale sequenza comprende un “*PstI* box” incompleto ed un “*BglII* box” integro, ed infine la regione con alto contenuto di purine compresa tra le due sequenze ripetute.
- Coppia di primer F3R1= Il prodotto di amplificazione è di 164 bp localizzata fra il sito di restrizione *BglII* e la sequenza di Shine e Dalgarno del gene *phzX*. Tale sequenza è mancante del “*PstI* box”, presenta un “*BglII* box”

incompleto e quindi la regione con alto contenuto di purine compresa tra le due sequenze ripetute.

Nella figura 3.2.4 è riportata una mappa fisica della regione intergenica analizzata.

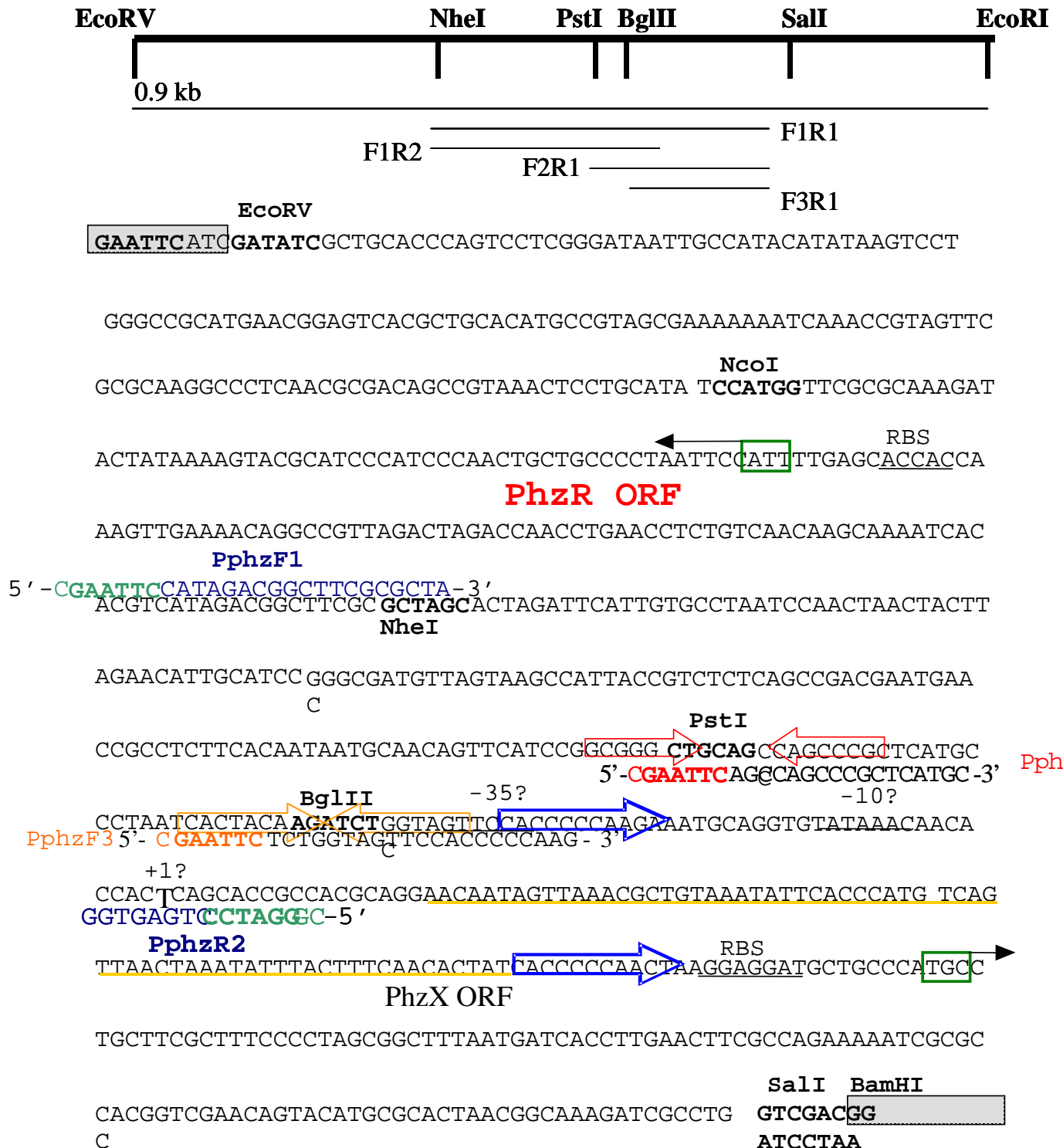


Fig. 3.2.3 Mappa fisica della regione intergenica analizzata dove sono riportati i primers utilizzati nel corso del lavoro.

I prodotti di amplificazione sono stati eluiti e purificati dal gel di agarosio e successivamente sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione EcoRI e BamHI in modo tale da poter trasferire i diversi frammenti nel vettore reporter pKT2-lacZ a sua volta digerito con gli stessi EcoRI BamHI , producendo i seguenti vettori:

1. pKT2 F1R1-lacZ
2. pKT2 F1R2-lacZ.
3. pKT2 F2R1-lacZ
4. pKT2 F3R1-lacZ

La regione intergenica di 900 bp è stata introdotta nel vettore reporter ed in un vettore pKT2 mancante del gene lacZ, producendo i vettori controllo:

1. pKT2 0.9-lacZ
2. pKT2 0.9

Nel seguito del lavoro, i vettori pKT2 0.9 e pKT2-lacZ sono stati utilizzati quali controlli negativi.

4. Valutazione dei prodotti di amplificazione

Tutti i vettori sono stati utilizzati per trasformare *E. coli* DH5 α producendo dei ceppi mutanti esibenti un fenotipo blu su piastre di LB- Xgal(2%), soltanto nel momento in cui il gene lacZ è controllato dai prodotti di amplificazione come mostrato nella foto 3.2.1.

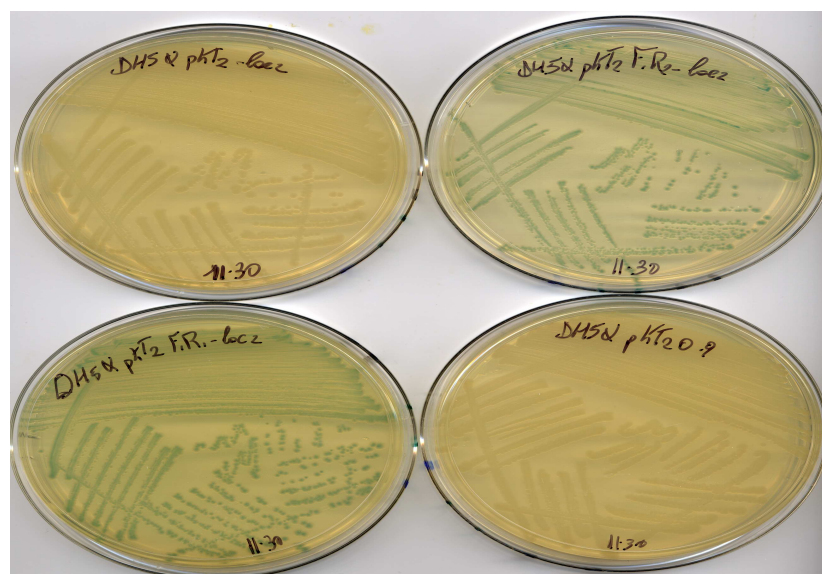
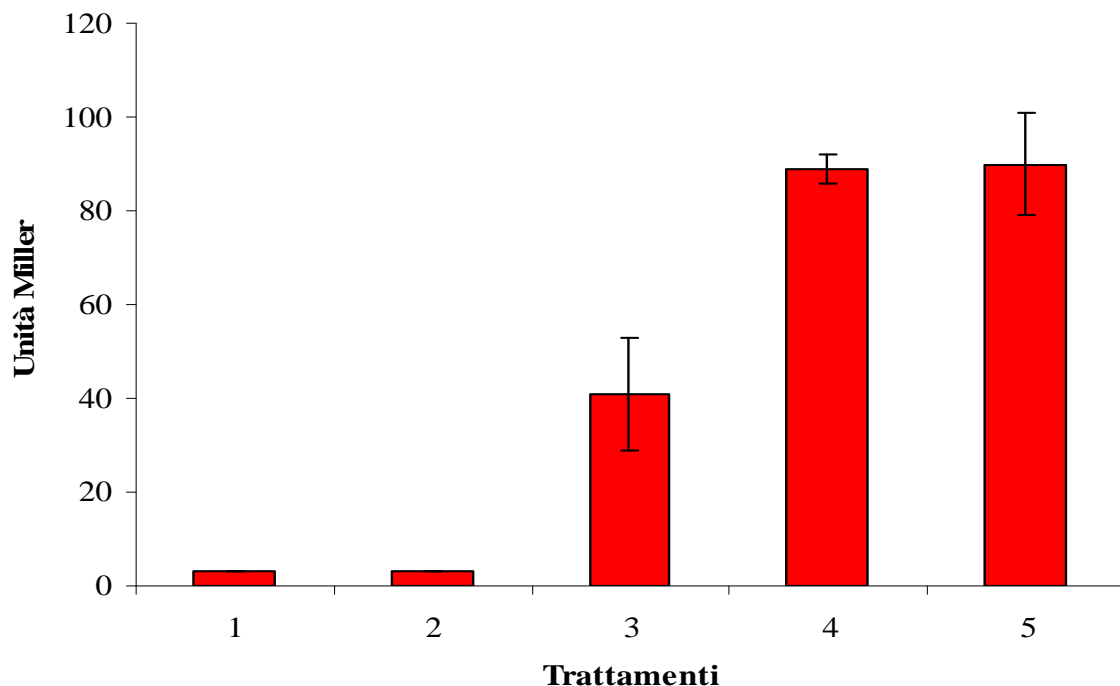


Foto 3.2.1 Ceppi di *E. coli* DH5 α trasformati con plasmidi contenenti prodotti di amplificazione a monte del gene lacZ.

L'attività galattosidasica è stata valutata mediante test della α -galattosidasi (Tab. 3.2.3).



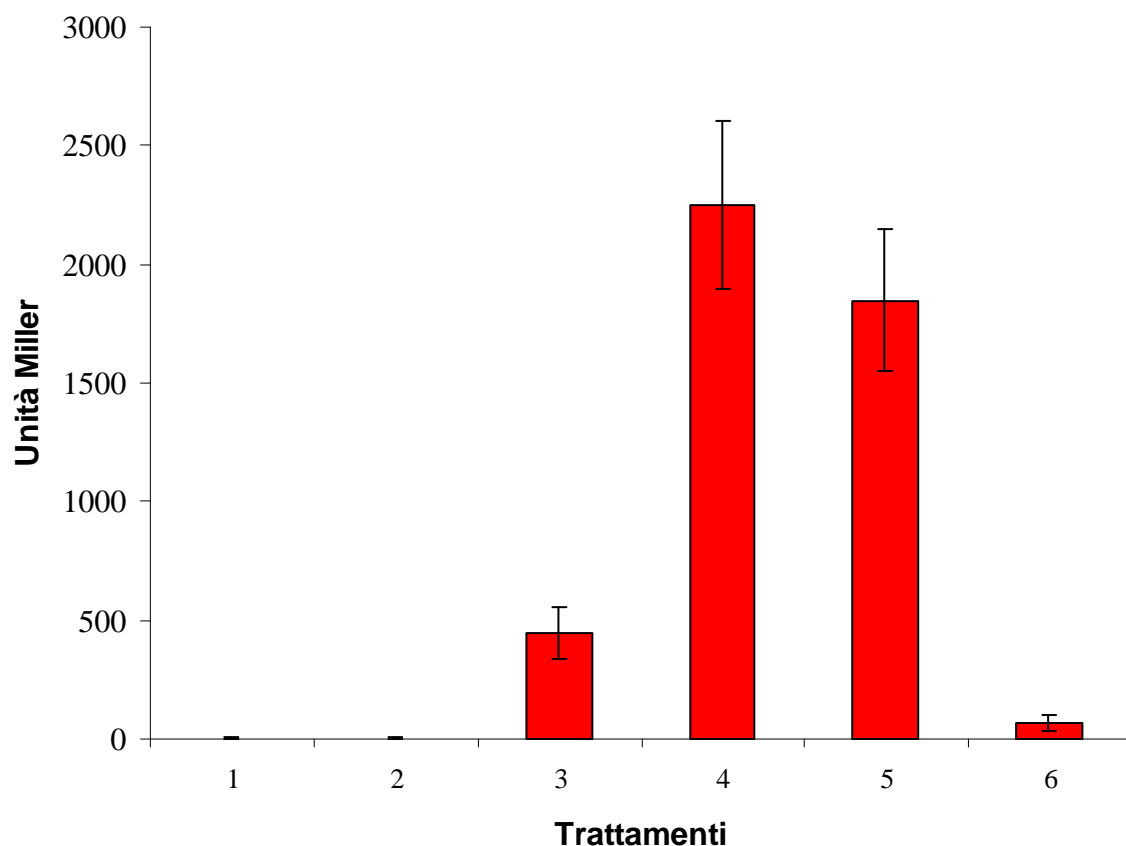
N°	Trattamenti	Unità Miller	Errore Standard
1	DH5a pKT2-lacZ	3	0
2	DH5a pKT2-0.9	3	0
3	DH5a pKT2-0.9-lacZ	41	12
4	DH5a pKT2 F1R1-lacZ	89	3
5	DH5a pKT2 F1R2-lacZ	90	11

Tab. 3.2.3 Risultati ottenuti da test della B-galattosidasi effettuati su ceppi mutanti di *E. coli* DH5 α .

I due vettori controllo, pKT2 0.9 e pKT2-lacZ, non hanno esibito alcuna attività galattosidasica, mentre i vettori in cui il gene lacZ è sotto il controllo della regione intergenica di 900 bp compresa tra phzR e phzX, o dei frammenti di amplificazione suoi derivati, hanno esibito una modesta attività enzimatica. Tale dato è la prima evidenza attestante la funzionalità del promotore dell'operone delle fenazine in *E. coli* in assenza del fattore trascrizionale PhzR.

I vettori prodotti sono stati trasferiti nel ceppo *P. aureofaciens* 30-84 Ice (phzB:inaZ) mediante triparental mating, e successivamente è stata valutata l'attività galattosidasica. Come è riportato dalla tabella 3.2.4 i due vettori controllo pKT2 0.9 e pKT2-lacZ non hanno prodotto alcuna attività galattosidasica, mentre tale attività raggiunge valori cento volte maggiori a quelli ottenuti in *E. coli* nel momento in cui il gene

lacZ è controllato dalla regione intergenica di 0.9 Kb, dalle regioni di 356 bp (F1R1) ed infine dalla regione di 245bp(F1R2).



N°	Trattamenti	Unità Miller	Errore Standard
1	3084 Ice pKT2-lacZ	4	2
2	3084 Ice pKT2-0.9	3	2
3	3084 Ice pKT2 0.9-lacZ	448	110
4	3084 Ice pKT2 F1R1-lacZ	2250	353
5	3084 Ice pKT2 F1R2-lacZ	1849	296
6	3084 Ice pKT2 F3R1-lacZ	67	31

Tab. 3.2.4 Risultati dei test della B-galattosidasi effettuati su ceppi mutanti di *P. aureofaciens* 30-84 Ice.

Dai dati ottenuti dai test della B-galattosidasi è stato possibile attestare che non vi è una differenza statisticamente significativa nel momento in cui il gene della galattosidasi (lacZ) è controllato dai frammenti di amplificazione F1R1 o F1R2.

Il plasmide pKT2 F3R1-lacZ non esibiva una rilevante attività galattosidasica indicando che il “BglII box” possa rappresentare un sito in cis essenziale per la funzionalità del promotore dell’operone delle fenazine.

Nel corso del lavoro non è stato possibile verificare l'attività del frammento di 184 bp prodotto utilizzando la coppia di primer F2R1, infatti, nonostante l'ottenimento dei prodotti di amplificazione, è risultato impossibile trasferire tale prodotto di amplificazione nel plasmide reporter pKT2-lacZ digerito con gli enzimi di restrizione EcoRI-BamHI.

5. Attivazione del promotore in diversi ceppi mutanti

5.1 Ceppi mancanti di geni PhzI e PhzR

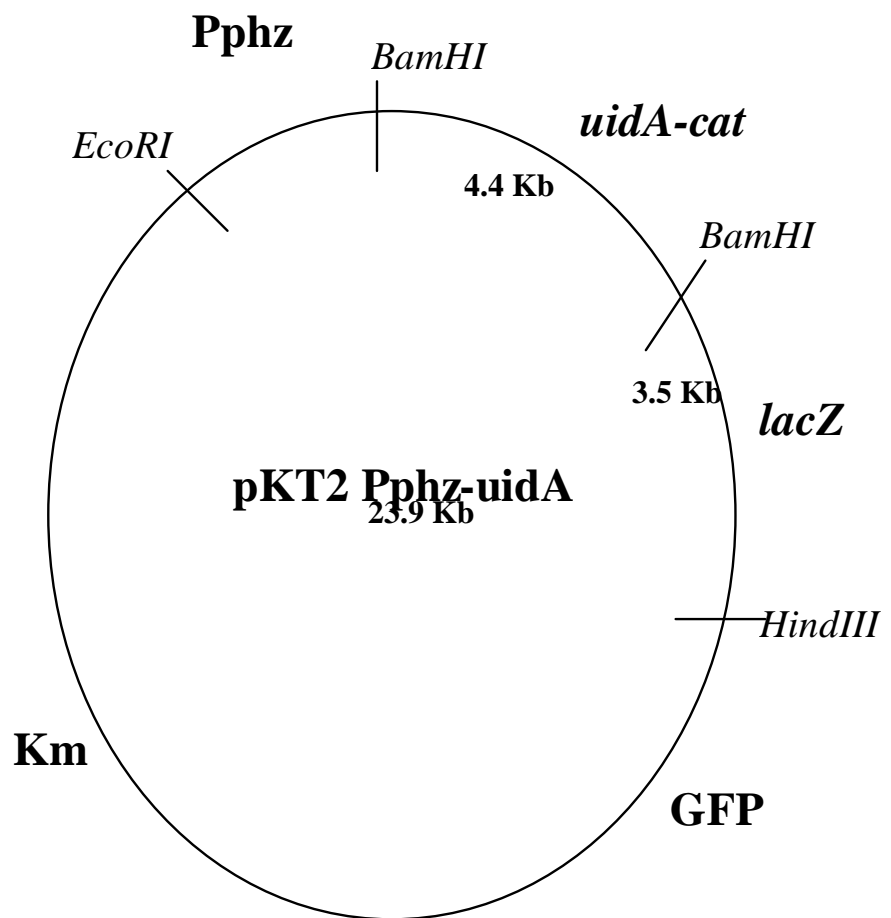
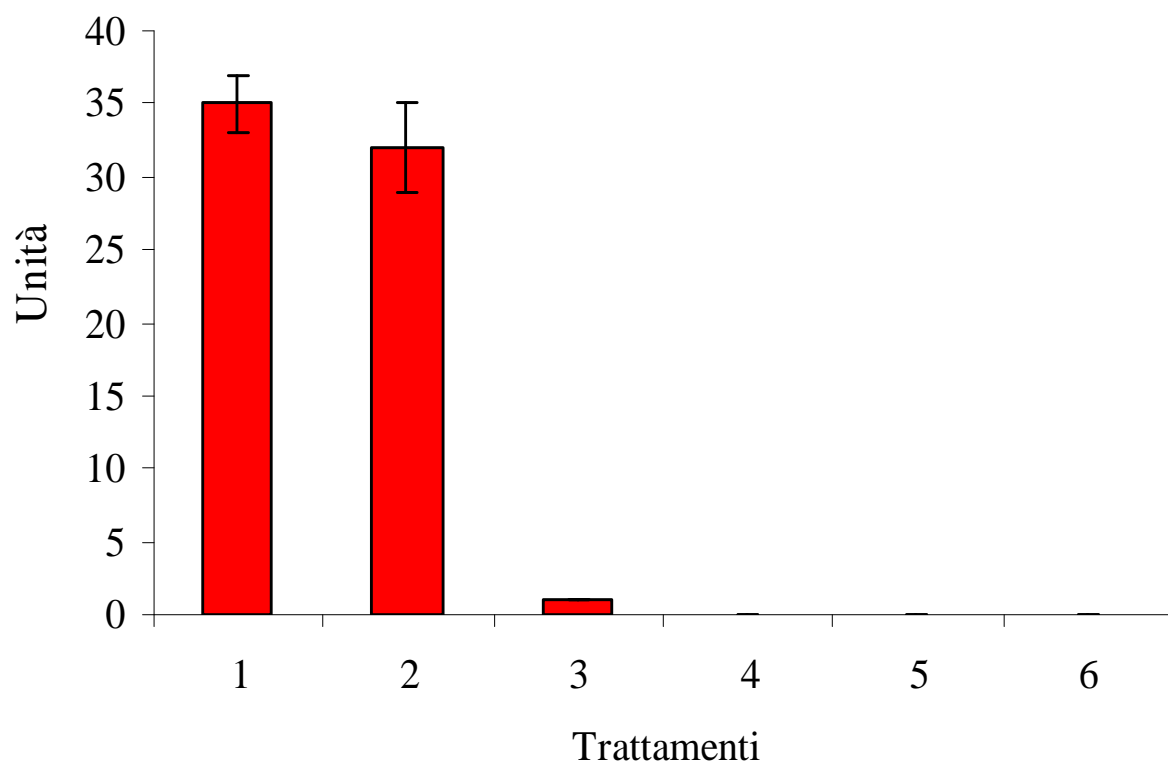


Fig. 3.2.5 Vettore reporter pKT2 Pphz-uidA in cui il promotore delle fenazine controlla l'espressione del gene reporter della glucoronidasi.

La cassetta di espressione uidA-cat del vettore pWM4 è stata escissa da tale plasmide mediante digestione con BamHI e successivamente trasferita nei plasmidi pKT2 0.9-lacZ, pKT2 F1R1-lacZ e pKT2 F1R2-lacZ, per produrre nuovi vettori reporter in cui il gene uidA (gene della glucoronidasi) è controllato dal promotore delle fenazine (Fig. 3.25).

I nuovi costrutti plasmidici sono stati mobilizzati nei ceppi *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 Ice, 30-84 R and 30-84 I e successivamente sono stati effettuati saggi per valutare l'attività glucoronidasica (Tab. 3.2.5).



N°	Trattamenti	Unità	Errore Standard
1	3084 Ice F1R1-uidA	35	2
2	3084 Ice F1R2-uidA	32	3
3	3084 I F1R1-uidA	1	0
4	3084 I F1R2-uidA	0	0
5	3084 R F1R1-uidA	0	0
6	3084 R F1R2-uidA	0	0

Tab. 3.2.5 Saggi Gus effettuati su ceppi mutanti di *P. aureofaciens* 30-84.

I risultati ottenuti durante queste prove hanno confermato che l'attivazione del promotore necessita di proteine PhzR o PhzI funzionali.

5.2 Ceppi mancanti di geni *rpeA* e *gacA* funzionali

Il vettore pKT2 F1R2-lacZ è stato modificato mediante il trasferimento del gene conferente resistenza alla tetraciclina (TcR) derivante dal vettore pHP45ΩTc. Tale gene è stato trasferito nel sito di restrizione HindIII del vettore pKT2 F1R2-lacZ generando il vettore denominato pKT2 F1R2-lacZ-TcR (Fig. 3.2.6) che di seguito è stato trasferito nei ceppi mutanti *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 W (GacA-) e 30-84 RpeA-.

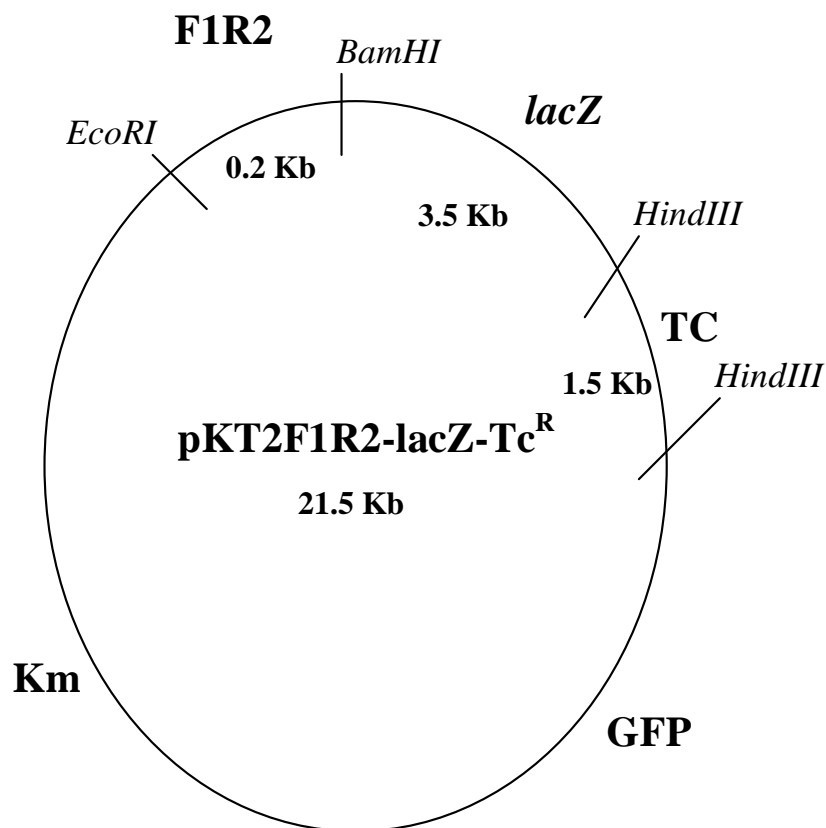
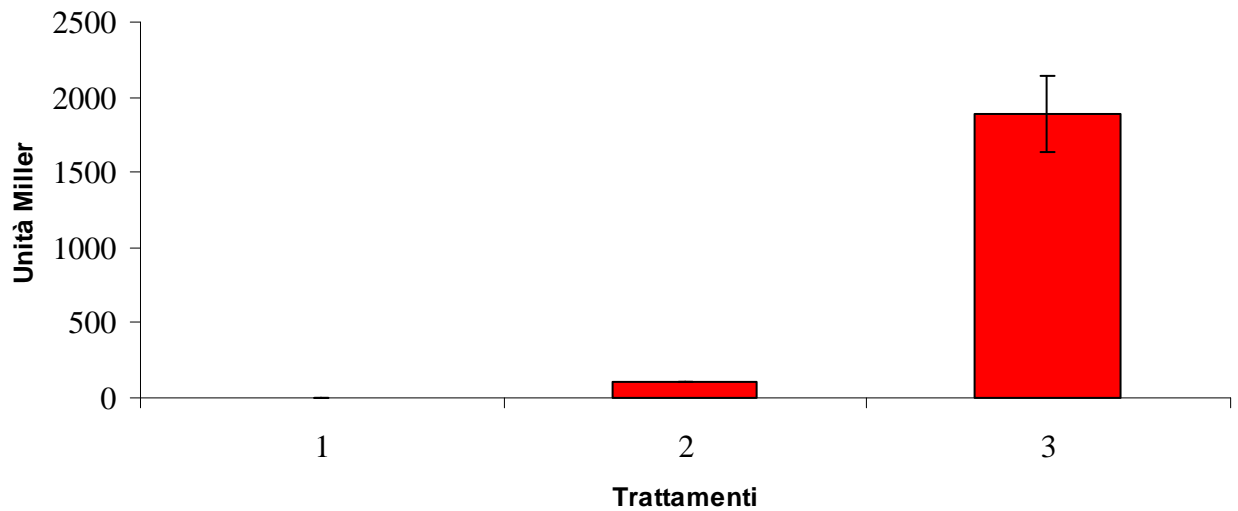


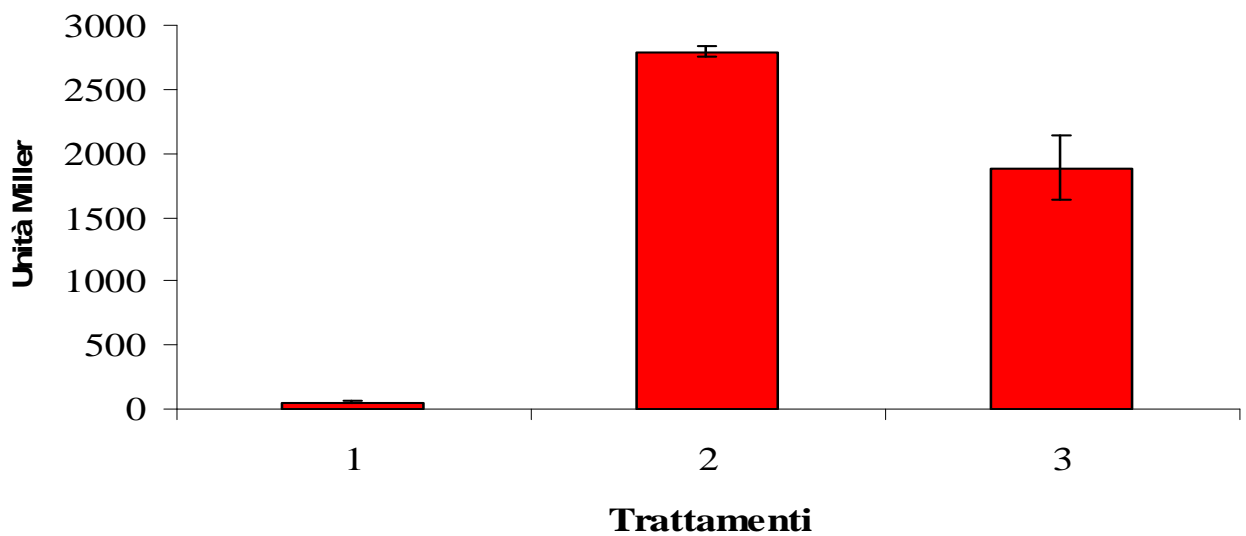
Fig. 3.2.6 Plasmide reporter pKT2-lacZ Tc^R utilizzato per determinare la funzionalità del promotore in ceppi mancanti dei geni GacA e di RpeA.

Non è stata rilevata alcuna attività del gene *lacZ* nel momento in cui il costrutto descritto precedentemente è stato mobilizzato nel ceppo *P. aureofaciens* 30-84 W mancante di un gene GacA funzionale e pertanto deficiente nell'espressione delle fenazine, in quanto incapace della attivazione dei geni *phzI* and *phzR*. I dati sono riportati nella tabella 3.2.6.



N °	Trattamenti	Unità Miller	Errore Standard
1	3084 W	2	0
2	3084 W pKT2 F1R2-lacZ	109	3
3	3084 Ice pKT2 F1R2-lacZ	1888	253

Tab. 3.2.6 Risultati test della B-galattosidasi riportati nel ceppo *P. aureofaciens* 30-84 W pKT2 F1R2-lacZ-Tc^R.

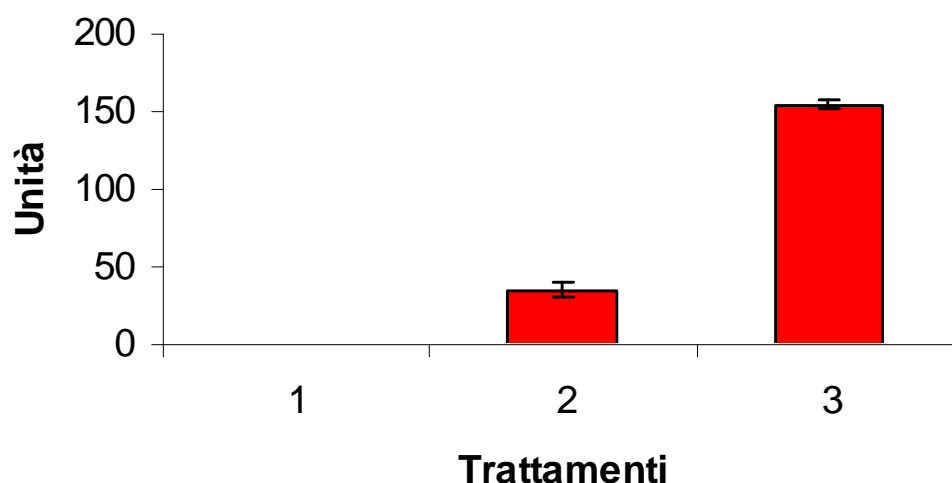


N °	Trattamenti	Unità Miller	Errore Standard
1	3084 RpeA ⁻	54	3
2	3084 RpeA ⁻ pKT2 F1R2-lacZ	2796	47
3	3084 Ice pKT2 F1R2-lacZ	1888	253

Tab. 3.2.7 Risultati test della B-galattosidasi riportati nel ceppo *P. aureofaciens* 30-84 RpeA⁻ pKT2 F1R2-lacZ-Tc^R.

Come è evidenziabile nella tabella 3.2.7 la perdita del gene *rpeA* ha comportato un incremento della attività galattosidasica nel ceppo *P. aureofaciens* 30-84 RpeA- pKT2 F1R2-lacZ-TcR in confronto del controllo *P. aureofaciens* 30-84 Ice pKT2 F1R2-lacZ-TcR.

Il vettore pKT2 F1R2-uidA-cat-lacZ è stato introdotto in trans in *Pseudomonas aureofaciens* 3084 RpeA- ZN, ceppo incapace nel produrre fenazine, dato che la pigmentazione giallo arancio dovuta alla produzione di tali antibiotici può in qualche modo andare ad inficiare la lettura spettrofotometrica e quindi può produrre errori di valutazione delle unità Miller. Alla luce di tutto ciò è stato creato il ceppo *P. aureofaciens* 3084 RpeA- ZN pKT2 F1R2-uidA, mancante dei geni *rpeA* e *phzB* funzionali. La valutazione dell'attività glucoronidasica in suddetto ceppo ha rivelato un incremento 5 volte nella attività del gene *uidA* (Tab. 3.2.8).



N°	Trattamenti	Unità	Errore Standard
1	3084 RpeA ⁻ ZN	0	0
2	3084 Ice pKT2 F1R2-uidA	35	5
3	3084 RpeA ⁻ ZN pKT2 F1R2-uidA	154	3

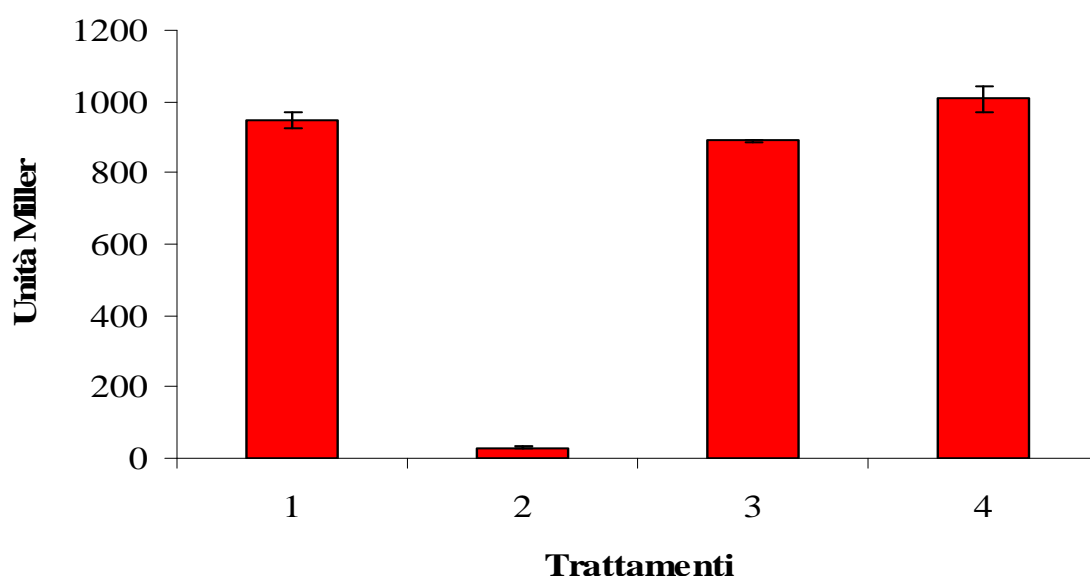
Tab. 3.2.8 Saggi Gus effettuati su ceppi mutanti di *P. aureofaciens* 30-84.

Capitolo III

Risultati-Parte III

1. Analisi del cosmide pLAF 13-6

Il genoma del ceppo di biocontrollo *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 è stato suddiviso in una libreria genomica. Tre cosmidi di tale libreria sono stati oggetto di analisi nel corso del lavoro di tesi. I cosmidi pLAF 13-6, pLAF 15-25 e pLAF 24-47 sono stati mobilizzati nel ceppo reporter *P. aureofaciens* 30-84 ZN (*phzB::lacZ*), con il fine di poter valutare l'influenza di tali frammenti di genoma sulla biosintesi delle fenazine. I valori dell'attività galattosidasi sono riportati nella tabella seguente (Tab. 3.3.1):



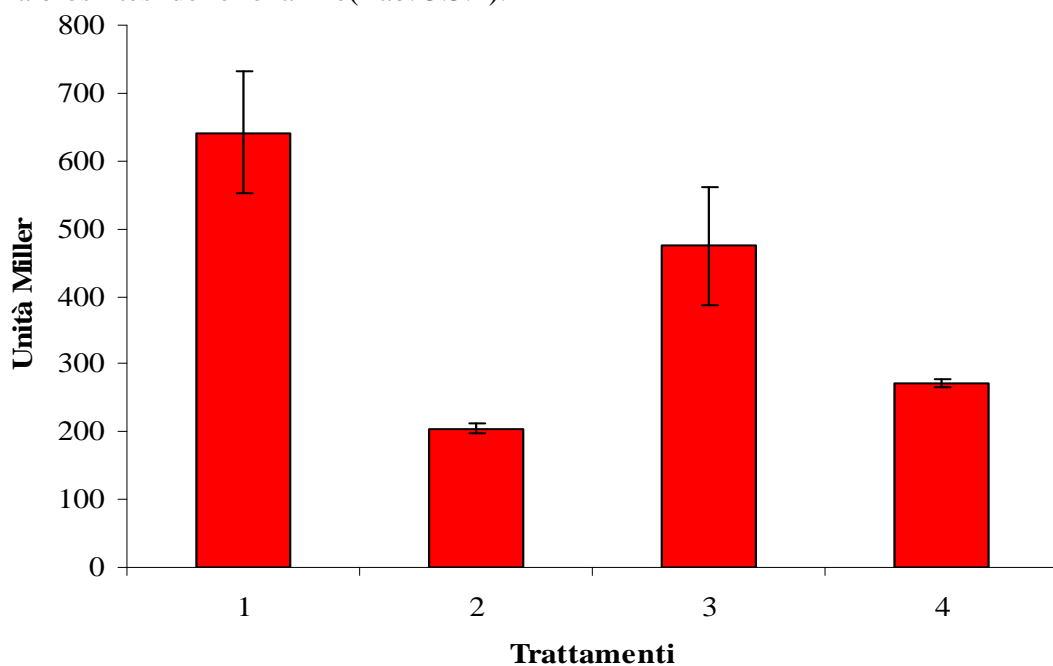
N °	Trattamenti	Unità Miller	Errore Standard
1	3084 ZN pLAFR3	947	22
2	3084 ZN pLAF 13-6	30	2
3	3084 ZN pLAF 24-47	889	3
4	3084 ZN pLAF 15-25	1007	35

Tab. 3.3.1 Test della B-galattosidasi eseguiti su tre diversi cosmidi della libreria genomica di *Pseudomonas aureofaciens* 30-84.

I dati ottenuti hanno mostrato una riduzione drastica nell'attività del gene *lacZ* allorquando il cosmide pLAF 13-6 è stato trasferito nel ceppo reporter *P. aureofaciens* 30-84 ZN, mentre i cosmidi pLAF 15-25 e pLAF 24-47 non hanno avuto alcun effetto sull'espressione del costrutto reporter *phzB:lacZ*.

2. Cloni del cosmide pLAF13-6

Il cosmide pLAF 13-6 consiste di una regione genomica di circa 9Kb clonata nel sito di restrizione *EcoRI* del cosmide pLAFR3. La digestione enzimatica di pLAF 13-6 con *EcoRI* ha prodotto due frammenti di DNA rispettivamente lunghi 4000 e 5000 bp. Tali frammenti sono stati successivamente clonati indipendentemente nel cosmide pLAFR3 digerito con *EcoRI* generando i costrutti pLAF R4000 e pLAF R5000, che a loro volta, sono stati mobilizzati nel ceppo reporter *P. aureofaciens* 30-84 ZN per valutare la loro influenza sulla biosintesi delle fenazine (Tab. 3.3.2).



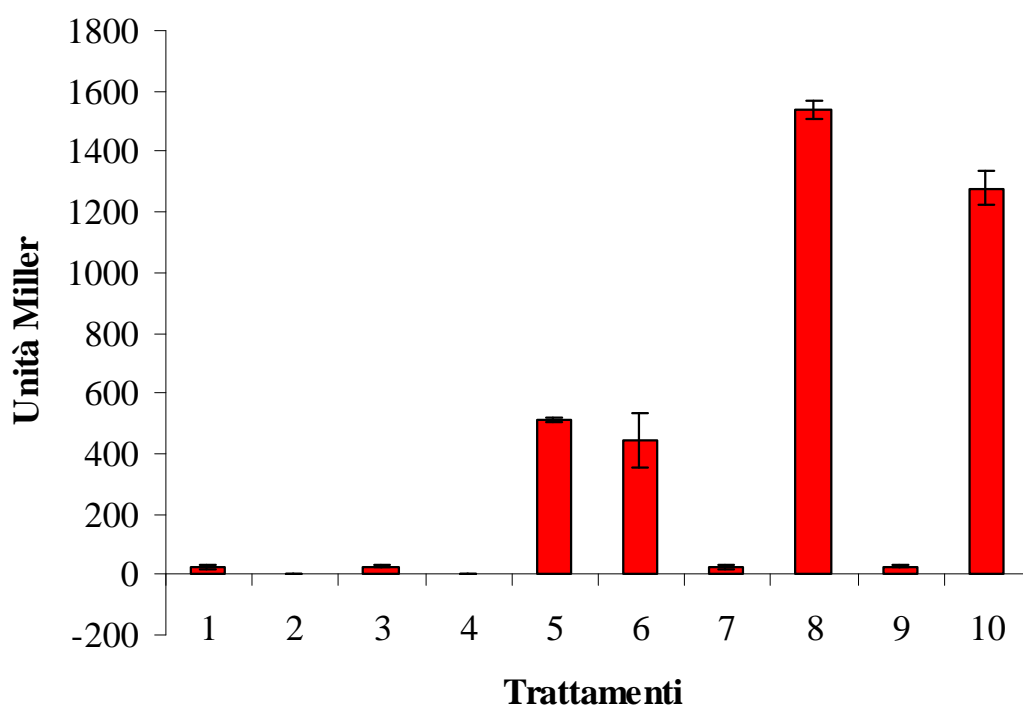
N°	Trattamenti	Unità Miller	Errore Standard
1	3084 ZN pLAFR3	641	90
2	3084 ZN pLAF 13-6	205	8
3	3084 ZN pLAF R4000	474	88
4	3084 ZN pLAF R5000	272	5

Tab. 3.3.2 Valutazione dell'attività in trans dei cosmidi pLAF R5000 e pLAF R4000

Come è possibile desumere dalla Tab. 3.3.2, l'effetto inibitorio del cosmide pLAF 13-6 è ancora presente nella regione di 5000 paia di basi mentre la regione di 4 KB

comporta una produzione di unità Miller non differente statisticamente dalla quantità prodotto nel ceppo controllo *P. aureofaciens* 30-84 ZN pLAFR3.

3. Effetti del cosmide pLAF R5000 sul promotore delle fenazine.



N°	Trattamenti	Unità Miller	Errore Standard
1	3084 Ice pKT2-lacZ/pLAF R5000	24	7
2	3084 Ice pKT2- lacZ	2	2
3	3084 Ice pKT2-0.9/pLAF R5000	28	2
4	3084 Ice pKT2-0.9	1	2
5	3084 Ice pKT-0.9-lacZ/pLAF R5000	510	6
6	3084 Ice pKT-0.9-lacZ	444	93
7	3084 Ice pKT2 F1R1-lacZ/pLAF R5000	25	6
8	3084 Ice pKT2 F1R-lacZ	1536	31
9	3084 Ice pKT2 F1R2-lacZ/ pLAF R5000	26	3
10	3084 Ice pKT2 F1R2-lacZ	1279	58

Tab.3.3.3 Effetto del cosmide pLAF R5000 sul promotore dell'operone delle fenazine

La drastica riduzione dell'attività del gene *lacZ* in *P. aureofaciens* 30-84 ZN ha reso opportuno un approfondimento riguardante il ruolo svolto dalla regione genomica clonata nel cosmide pLAF R5000 nell'attivazione del promotore dell'operone delle fenazine. Tale cosmide è stato mobilizzato nei ceppi precedentemente creati 30-84 Ice pKT2 0.9-lacZ, 30-84 Ice pKT2 F1R1-lacZ e 30-84 Ice pKT2 F1R2-lacZ, generando nuovi ceppi mutanti resistenti sia a kanamicina che a tetraciclina (Tab. 3.3.3).

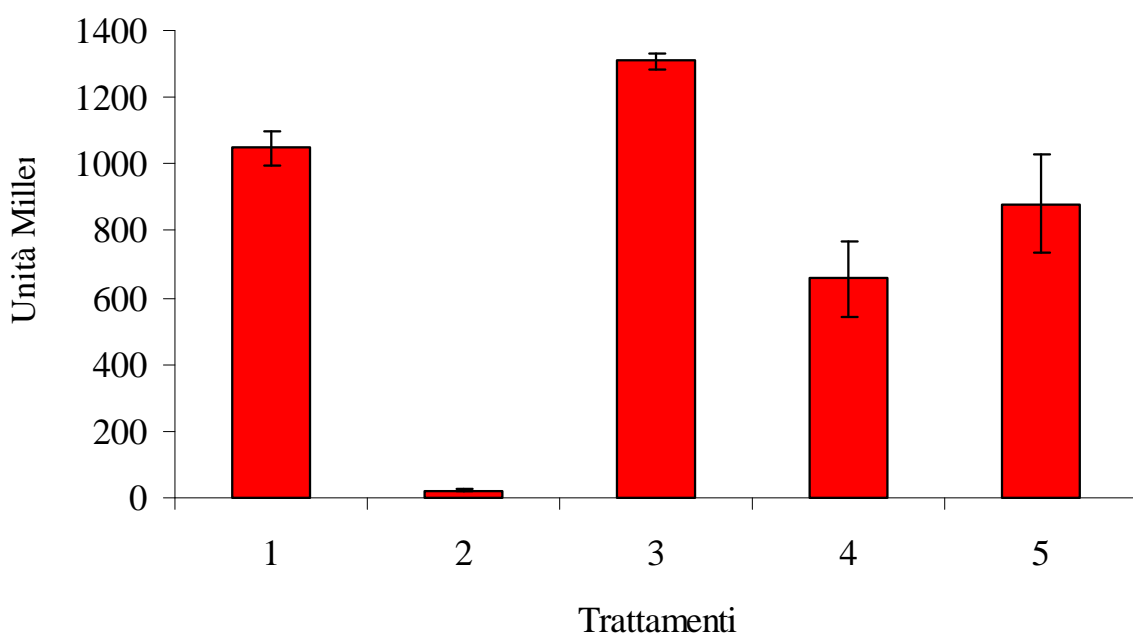
Dai dati riportati in tabella 3.3.3 è assumibile che la regione 5000 bp derivante dal cosmide pLAF 13-6 possa essere coinvolta nel controllo dell'attivazione del promotore nel momento in cui il gene *lacZ* è controllato dai frammenti F1R1 e F1R2 della regione intergenica tra *phzR* e *phzX*; mentre non è stata riscontrata alcuna riduzione della attività galattosidasiica allorquando la suddetta regione (pKT2 0.9-lacZ) è collocata integralmente a monte del gene reporter.

4. Analisi di pLAF R5000

La regione di 5000 bp è stata digerita indipendentemente con quattro diversi enzimi di restrizione, rispettivamente *BamHI*, *HindIII*, *PstI* e *Sall*; fra di essi l'enzima *BamHI* ha prodotto due frammenti di restrizione (0.5 Kb e 4.5 Kb) mentre *Sall* ha prodotto tre frammenti rispettivamente di 450 bp, 3 Kb and 1.5 Kb. Gli enzimi di restrizione *HindIII* e *PstI* non hanno presentato alcun sito di taglio all'interno della regione analizzata.

Tutti i frammenti derivati dalla digestione con *Sall* sono stati clonati nel sito *Sall* del vettore pPR510, dato che il vettore pLAFR3, usato in precedenza, presenta un sito di restrizione *Sall* all'interno del gene di resistenza all'antibiotico tetraciclina. In tal modo sono stati creati i vettori pPR510 RS1500, pPR510 S3000 e pPR510 RS450 che hanno costituito dei vettori ponte per il successivo trasferimento dei suddetti frammenti di pLAF R5000 nel cosmide ad ampio spettro d'ospite pLAFR3 digerito con gli enzimi di restrizione *EcoRI* e *HindIII*, producendo così pLAF RH1500, pLAF RH3000 e pLAF RH450. I vettori prodotti sono stati successivamente mobilizzati mediante triparental mating nel ceppo reporter *P. aureofaciens* 30-84 ZN, in modo da poter valutare l'effetto dei singoli costrutti sull'attività galattosidasiica (Tab. 3.3.4).

I valori di unità Miller illustrati nella tabella 3.3.4 non hanno confermato i risultati precedentemente ottenuti con l'analisi della regione di 5000 paia di basi integra, pertanto è stato ritenuto opportuno convalidare tali risultati trasferendo i vari cosmidi sinora esaminati (pLAF R5000, pLAF RH1500, pLAF RH3000 e pLAF RH450) nel ceppo 30-84 wild type di *P. aureofaciens*, andando consecutivamente a valutarne l'effetto diretto sulla produzione delle fenazine. I fenotipi prodotti sono illustrati nella foto 3.3.1.



N°	Trattamenti	Unità Miller	Errore Standard
1	3084 ZN pLAFR3	1047	50
2	3084 ZN pLAF R5000	23	4
3	3084 ZN pLAF RH3000	1309	23
4	3084 ZN pLAF RH1500	656	115
5	3084 ZN pLAF RH450	880	146

Tab.3.3.3 Effetto dei cosmidi pLAF RH3000, pLAF RH1500 e pLAF RH450 sull'attività galattosidasi.

Una totale riduzione della produzione delle fenazine è stata riscontrata nel momento in cui il costrutto cosmidico pLAF R5000 è presente *in trans* nel ceppo wild type 30-84, mentre l'introduzione *in trans* dei cosmidi pLAF RH3000 e pLAF RH450 non hanno indotto alcuna mutazione nel fenotipo del ceppo wild type.

In modo inaspettato il cosmide pLAF RH1500 ha prodotto un fenotipo interessante. Il ceppo *P. aureofaciens* 30-84 pLAF RH1500, difatti, ha presentato una maggiore produzione di fenazine comprovata da un fenotipo rosso intenso e da un quantitativo maggiore di fenazine ottenuto mediante estrazione benzenica dei surnatanti di tale ceppo batterico dopo una crescita ad una temperatura di 28°C di 24 ore.

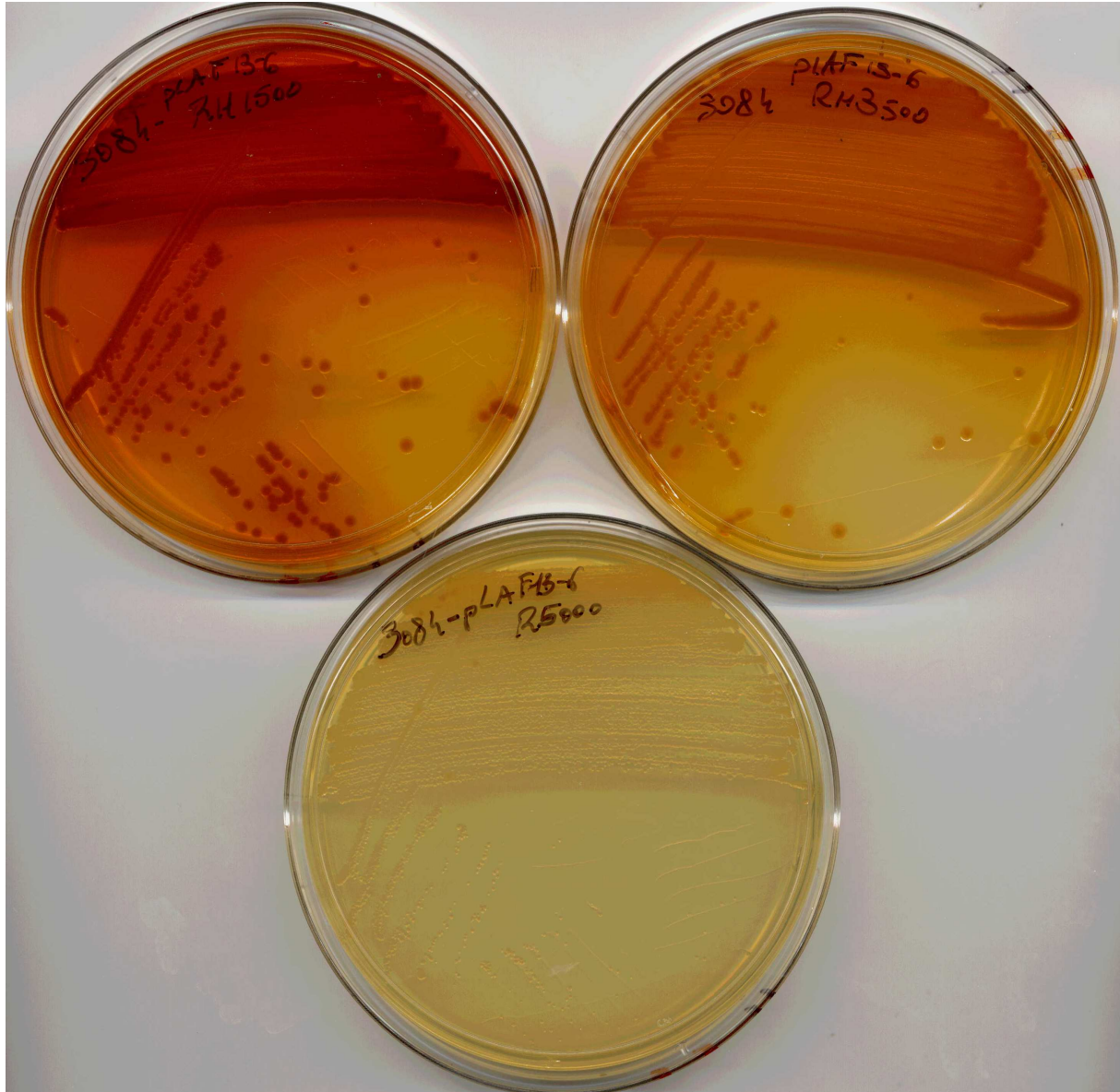


Foto 3.3.1 Fenotipi prodotti dall'introduzione dei vettori pLAF R5000, pLAF RH3000 e pLAF R1500 nel ceppo wild-type *P. aureofaciens* 30-84.

La presenza *in trans* della regione di 1500 paia di basi derivante dal cosmide pLAF 13-6 ha presentato la caratteristica importante di poter stimolare la produzione di fenazine anche su substrati minerali quale l'MM9, substrato sul quale il ceppo 30-84 wild type è capace di produrre solo modeste quantità di fenazine. Tali dati sono stati confermati da estrazione di fenazine, nelle quali i ceppi batterici saggiati sono stati allevati su MM9 liquido per 24 ore.

5. Sequenziamento di pPR510 R5000

La regione di 5000 bp derivante dal cosmide pLAF 13-6 è stata clonata nel sito di restrizione EcoRI del vettore PR510 *EcoRI* site producendo pPR510 R5000, vettore utilizzato successivamente per il sequenziamento di tale regione genomica. Mediante l'uso della coppia di primer M13 è stato possibile il sequenziamento della intera regione, come riportato nella tabella successiva (Tab. 3.3.4).

```

1  GCAGCCTTCG GCGGCCAGCG CGGCAATCAA TTGCTGGCGC AGCGACTCGC
51 TGTAGGGATA GCTGAAGTCG ATGTGGGTGA CCTGCTCCAG GTCGTGGGCA
101 AAATAGGTGT GCTCAGGACC GCTGGTGTAG TCGATCAGCT GATGCGGCAC
151 GCAGAAATGC CCGGAGCCCA TCGCCGGATG AATGCCACCC ACCGCGTTGA
201 CCGCCAGAAT CGCCTCGGCG CCAGCCTGCT TCAGCGCCCA GAGATTGGCC
251 CGATAGTTCA CCTGATGCGG CGGGAAGCGA TGTGGATGAC CGTGACGCGC
301 CAGAAACAGC ACCTCGCGAC CGGCGTATTC ACCCTTCTGG ATATCCGCCG
351 ACGGAGCGCC ATAGGGCGTG TCCAGGGGCA AGGATTGGTG AATGCTCAAG
401 CCTTCGAGCC GGGTCAGGCC GGTACCGCCA ATAATCGCGT AGACCGTCAT
451 CGCAAAAGCC CTTAATCGAT CAGTTGGGCA TCTTTGAGTG CGCCGAGCGC
501 CGTCAGCCAA CGCGGATCCT GACGATAGTC GGTGCAGGCA AACGCCTGGC
551 CACGCATCCG CGCAATACGC GCCGACGGCG TCACTTTTCAG ACGCTGGGCC
601 GCGCTCAGGG CCAGCTCGGC CGCCGCCCGG TCGTTGCACA CCAGGCCCAT
651 GTCGCAACCG GCCGACAGCG CCGCTTCGAT CCGGCTCGCG GCATCGCCCA

```

ORF1

701 CCACATGAGC ACCGGCCATC GACAGGTCGT CACTGAAGAT GACACCGTCG
 751 AACTGCAATT CACCGCGCAG GATCTCCTGC AACCAACGAC GGGAGAACCC
 801 GGCTGGCTGG GCATCNACCT GAGGTAGATG ACGTGGGCCG GCATCACCGC
 851 CGCCAGTTGC TTGC~~TCAGGC GCGCGAAAAG CACCAGGTCC TTGGCGCGAA~~
 901 ~~TCTCGTCGAG GCTGCCCTCG TCATTGGGGA TCGCCACGTG GGAATTCCCC~~
 951 ~~TCGGCCNANC CNTGCCCCGGG AAAATGCTTG CCGTGGCCNC CATGCCGGCN~~
 1001 ~~CTGTTNATGC CACGGATAAA GGCGCCTGCC AGCAAGGCGG CGCGCTCGGG~~
 1051 ~~GTCGCCCTCG AAGGAACGGG TGCCCACCAC GGCGCTGCGC TGATGATCGA~~
 1101 ~~GGTCCAGCAC CGGCGCGAAG CTCAGGTCCA GGCCGACGGC CAGCACTTCG~~
 1151 ~~GTGGCCATGA TCCAGCCGCA CTGCTCGGCC AGGTACTCGG CATTTCGGATT~~
 1201 ~~GTCGGCGATG GCGCGCATGG CCGGCAGCCG CACGAAGCCC TGGCGCAGGC~~
 1251 ~~GTTGCACGCG ACCGCCCTCC TGGTCCACCG CCAGCAGCAG GTCCGGGGCGA~~
 1301 ~~ATCGCCCGGA TGGACGCGCT CAGCTCACGC ACCTGCCGCG GATGCTCGAT~~
 1351 ~~ATTGCGGGCA AAGATGATCA GCCCGCCCAC TTCGGGCTGG CGCAGGAGTT~~
 1401 ~~GGCGATCTTC AGCCGTCAGC CAGGTACCGG CGACATCCAC CATCAAGGAG~~
 1451 ~~CCTTGCAGGC CTGTGGT~~CAT~~ AGCAATTCTT TAGTAACGAA GTGCGCGCAC~~
 1501 GACACCGCAA AGGGTGCTGG CGTGCGCGG ACGCACGAGT CCATTGCCGG
 1551 CGGCAANGCC CGGCAAGCGA CGATCGGCGA AAGGTGTGAA GAGAGGTAGG
 1601 AAACGAGAGT CGACATGGGC GGCTAGCTTA GCGGATGTAA GCTGCCGCGC
 1651 CCACCCGGAC GG~~TCAGGCCT~~ TGGCGACCGC CGGAGTCGAT TTGCTGCGTG
 1701 ~~GCTTAAGCTG TGCCGTGGCC ATGGCATCAT CGGTGACGCC GGTTTCGGCG~~
 1751 ~~CGCATGCCGG CCGCGAGGAA CGGCACCATC AGACGCATTA CCTGCTCGAT~~
 1801 ~~CGAGGTATTG ACCCCGAAGT CGGTCTCGGC AATCGCACGC AAGGCCTTGA~~
 1851 ~~TCCCCGACAT GCTGAAAGCC GCCGCTCCCA GCATGAAGTG CACACGCCAG~~
 1901 ~~AACAGTTCGA TCGGCGGGAT ACGCGGCGCG GCTTCGTTGA CCAGCAGCAT~~
 1951 ~~GTAGCGGCGG AACACCTTGC CGTACATGTC TTCCAGGTAA CGCCGCAGGT~~

ORF2

ORF3

2001	<u>GCCCCTGGCT CTGGCTGAAG GCCAGGCCCA GAAGGCGCAT GAAAATGGAC</u>	
2051	<u>AGGTCGTTGC CGCTGCGAGG CTGGACCACC AAGGCCTGCT CGACGAGGAT</u>	
2101	<u>TTCCAGCAGC TCTTCGAGGC TTGGCTTACT GTCCGGCTTG GCCGAACGCC</u>	
2151	<u>GCTCCAGCTC ACGGTCGAGG CTGATGCAGA ACGGCCCGAG GAAGCGCGAG</u>	
2201	<u>AACACCGCCT GGATCAGGGC CTTTTTGGAA CCGAAATGAT AATTCACCGC</u>	ORF3
2251	<u>CGCCAGGTTG ACCCCGGCCT TGCTGGTGAT CAGCCGCAAT GAGGTTTTCGG</u>	
2301	<u>CAAAACCTTT TTCCGCGAAC AACTGCTCGG CAGCATCGAG AATGCGTTCA</u>	
2351	ACGGTTTCCG <u>ACTGGGC</u> CAT GGCTACTCCT CCTGA <u>CAAAC</u> ACTT <u>GTTTGA</u>	
2401	<u>AACATACGTT</u> <u>TCAGCCCCAG</u> CCTTGTC AAG CCTGCCTGTC CGTTTTGCGG	
2451	<u>CCGGTCAGTC AGCTAT</u> <u>TTAA</u> <u>TCATACCTGC CGCTTCCTGT AGCCAGCCAC</u>	
2501	<u>GCGACACCAG GCATGCGCAG CGGCGACCCG ACCGTCCAGC GGCGATTGGA</u>	ORF4
2551	AAAANGAGGA TNGCCAANCG <u>GCAT</u> TCACTG TATATAATTC CAGTCACTGT	
2601	ATAAAAAGAN ANANCGATCG ANATGCTNAA ANCTGACNCC ACNCCAAGCT	
2651	GAGATTCTGG CTTTTATCAA ACGCTGCCTC GAAGACAACG GCTACCCACC	
2701	GACCCGCGCG GAAATCGCCC AGGAACTGGG TTTCAAGTCG CCCAACGCCG	
2751	CCGAAGAACA CCTCAAGGCG CTGGCCCGCA AAGGCGCGAT CGAA <u>ATGACT</u>	
2801	<u>CCAGGCGCCT CCCGCGGTAT TCGTATCCCG GGGTTCGAAG CCAAGCCCGA</u>	
2851	<u>CGACTCCAGC CTGCCCATCA TTGGCCGGGT TGCCGCCGGT GCTCCGATTC</u>	
2901	<u>TCGCAGAACA GCACATCGAA GAGTCCTGCA ACATCAATCC GGCGTTCTTC</u>	
2951	<u>CACCCCCGTG CAGACTACCT GCTGCGGGTT CACGGCATGA GCATGAAGGA</u>	
3001	<u>CATCGGCATT TTCGATGGCG ACCTGCTGGC CGTGCATACC ACTCGCGAGG</u>	ORF5
3051	<u>CCCGCAACGG CCAGGTCGTC GTCGCCCGCA TTGGCGACGA AGTCACCGTG</u>	
3101	<u>AAACGCTTCA AGCGCGAAGG CAGCAAAGTC TGGCTGATTG CCGAAAACCC</u>	
3151	<u>TGAGTTCGCC CCTATCGAGG TCAACCTGAA AGATCAGGAC CTGGTGATCG</u>	
3201	<u>AAGGCTTGAG TGTCGGCGTC ATTCGCCGCT</u> <u>AA</u> AGGAGGCT GTATGCAGTT	
3251	<u>CCCTCACACA CCACAGC</u> <u>ATG</u> <u>CACAACTGCC ACTGTTCGAA GCGTTCATGG</u>	

3301 CCCAACCCCN TGGCGCCTAT CCTCAAAGAG GTCGTCGAAT CGTCCTGGAA
 3351 CANCGAACCG GAAGCCTTCA GTGAACTGTC GTTACNCGGT GNCCNCCGGG
 3401 AANTGCCTTG ANCCTGCTGG CNCCCATCCT CAGGGAAGTG ANGGATCGCC
 3451 AGGACCAGGA TGCGCGCTGG CTGACATTGA TTGCCCCGCC GGCCAGCCTG
 3501 ACCCAGGCCT GGTGCGGGA TGCCGGCCTG AACCGCGAAC GGATTCTGCT
 3551 GCTGCACCCG CGCGGCGCCC AAAGCGCGCA **ACAGCTGGCT** TGCGAGGCTC
 3601 TGCGCCTGGG ACGCAGCCAC ACCGTTGTCA GCTGGCTCAA CCCGCTGAAC
 3651 AGCAGCGCCC GTCAACAGCT CATCAGCGCA GCCCGCACGG GCGACGCACA
 3701 AAGCCTGAAT ATTCGTCTGG GCTGACCGCT AGAAGCGTCG ATGGACACGC
 3751 TTGAATGACA CAAGGCTTCT CCAGGATTGA GAAGCCGGAA GGAGGCGACG
 3801 AACGACAGCA AAAAAACCGA CAAACGGACT CAGTGAAGAA TCCGTGGCCC
 3851 CTCTTCTTTC TCCAATTCGC CTTCAACCAG GCGACCCGCC ATCTGCACAC
 3901 CCACGCTCAA CATGGCCTTG GCCACCTCGA CATGCTGGCC TTGCAAGAAG
 3951 GCTTTGGCAT CTTCTGAAAA GTCCAGAGTG ACCAGAGAAC CCTCGTCCTC
 4001 GGCCCTGCGC AGCTCGATAC GACCGTCTGG CAATTCGACA ATTTCTAGAA
 4051 AGGACGTTGG CATAAAGGTC TGTTCTCCAC GAAAGGCCGG GATTATATCA
 4101 GTCATCACCC CGACCTCGCG CGGGCCCAA CGGTTTTCTT TATTGGCCTG
 4151 ACGTTACAAA CAGGCATTTG CCATCAGAAA TTCGGCCTGT AATCAAAATC
 4201 TTNGNGGGGG CTTCCTTATC GGAAAACGGC GTAATGGCCT GCTTCTTGTT
 4251 GATGACCGTG TGACNTCGAN TGCGCCTCAC CACTGGCCGC CTCAGGCAAC
 4301 CTTCCGAGGG CCGAACGCNG GCCCACCCT TTCTCCAGCA CGTTGCTTTC
 4351 ATAGATCTTG AAGCTGGAAG CCTGCTCCTC CAGGGCATCC AGCACCTTGA
 4401 TCTTCTGCCG CTCATACACG AGCACATCGG CCCATGCGCG CTGAGCACGG
 4451 TTCCCTGCGC CGACAATCTT GTTGTAGTAG TACCAGAGGA GCCAGGCCAC
 4501 CAGTATCGCT GTAAGAAGGA TGATCATTTA CTGCTCCATG TCCTGCGTTC

ORF6

ORF7

ORF8

4551 TTTTCTTCGG TAGATTGAAA TTGTCGTCATV GCAACTCGGC AAACTGGTGC
 4601 AACAGCTCCA GCACCGGCCT CAGGCGCGGC ATCGTCGCCC CCTGCATCAA
 4651 GCCGGCATGA AAGGCGACCG GCTCCGCAAG GCTTACCGCC GAGGTAGCGA
 4701 TGCCAACCAC ATCATCATTG TTGAAGCTCA CGCATAGGCG ACTCTGGGAG
 4751 GAAAACTCGA AACTGACGTC TTTCAGCTCC TTGGCGATCT GCAGCAACTT
 4801 GAGCACGGTG ACCGGTGTGG CGAAAGTCGC GCAGGCCATC TCCGTCGCGC

ORF9

Tab. 3.3.4 Risultati ottenuti dal sequenziamento del cosmide pPR510 R5000.

L'analisi dei differenti open reading frames è stato effettuato usufruendo del software gratuito "ORF Finder" disponibile sul sito web dell'NCBI. L'uso di tale software ha messo in risalto un elevato grado di omologia con geni già caratterizzati in differenti specie batteriche afferenti al genere *Pseudomonas* quali, ad esempio, *Pseudomonas chlororaphis*.

- ORF1 ha esibito una buona omologia di sequenza con il gene *mtnP* identificato nel ceppo *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. Tale gene codifica per una metiltioadenosina-fosforilasi, proteina coinvolta in un pathway metabolico indicato come "Methionine Salvage". Il substrato S-adenosil-metionina (SAM) rappresenta il punto di unione di tale pathway metabolico con la biosintesi di omoserina lattoni o molecole segnali.



Methylthioadenosine phosphorylase *Pseudomonas fluorescens*
PfO-1

Score = 286 bits (731), Expect = 8e-76

Identities = 133/150 (88%), Positives = 145/150 (96%), Gaps = 0/150 (0%)

```

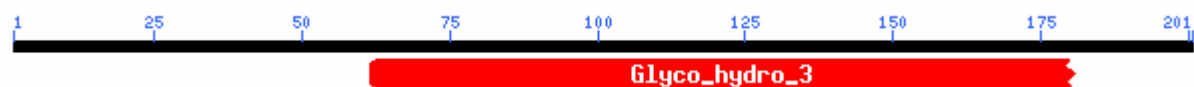
Query   70   MTVYAIIGGTGLTRLEGLSIHQSLPLDTPYGAPSADIQKGEYAGREVLFLARHGHGPHRFP
129
      MTVYAIIGGTGLT+LEGLSI QSL +DTPYGAPSA++Q GEYAG+EVLFLARHGHGPHRFP
Sbjct   1    MTVYAIIGGTGLTQLEGLSIRQSLAVDTPYGAPSAEVQIGEYAGKEVLFLARHGHGPHRFP
60

Query   130   PHQVNYRANLWALKQAGAEAILAVNAVGGIHPAMGSGHFCVPHQLIDYTSGREHTYFADD
189
      PH+VNYRANLWALKQAGAE+I+AVNAVGGIHPAMG+GHFCVPHQ++DYTSGREHTYFADD
Sbjct   61   PHKVNYRANLWALKQAGAESIIAVNAVGGIHPAMGTGHFCVPHQVVDTSGREHTYFADD
120

Query   190   LEQVTHIDFSYPYSESLRQQLIAALAAEGC   219
      LE VTHIDFS+PYSE LRQQLIAALAAEGC
Sbjct   121   LEHVTHIDFSFPYSEPLRQQLIAALAAEGC   150

```

- ORF2 ha esibito una omologia del 96% con il gene *nagZ* identificato nel ceppo *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. Il gene *nagZ* codifica per una B-N-acetilglucosamminidasi responsabile della lisi della componente mureinica in N-acetilglucosamminina ed acido mureico, reazione rappresentate il punto di inizio di un pathway metabolico correlato alla continua digestione e ricomposizione della



parete cellulare batterica.

beta-N-acetylglucosaminidase-like protein *Pseudomonas*
chlororaphis

Score = 311 bits (796), Expect = 2e-83

Identities = 158/165 (95%), Positives = 159/165 (96%), Gaps = 0/165 (0%)

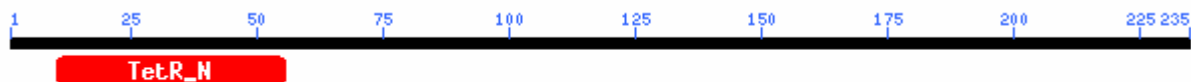
```

Query   5.LQGSLMVDVAGTWLTAEDRQLLRQPEVGGLIIFARNIEHPRQVRELSASIRAIRPDLLLA   64
      +QGSMLMVDVAGTWLTAEDRQLLRQPEVGGLIIFARNIEHPRQVRELSASIRAIRPDLLLA
Sbjct   1 MQGSMLMVDVAGTWLTAEDRQLLRQPEVGGLIIFARNIEHPRQVRELSASIRAIRPDLLLA   60

```

Query	65	VDQEGGRVQRLRQGFVRLPAMRAIADNPNAEYLAEQCGWIMATEVLAVGLDLSFAPVLDL	
124			
		VDQEGGRVQRLRQGFVRLPAMRAIADNPNAEYLAEQCGWIMATEVLAVGLDLSFAPVLDL	
Sbjct	61	VDQEGGRVQRLRQGFVRLPAMRAIADNPNAEYLAEQCGWIMATEVLAVGLDLSFAPVLDL	
120			
Query	125	DHQRSADVGTSTRSFEGDPERAALLAGAFIRGXNXAGMXATASIFPG	169
		DHQRSADVGTSTRSFEGDPERAALLAGAFIRG N AGM AT FPG	
Sbjct	121	DHQRSADVGTSTRSFEGDPERAALLAGAFIRGMNSAGMAATGKHFP	165

- ORF3 ha presentato un elevato grado di omologia con il gene *psrA* (*pseudomonas sigma regulator A*) identificato nel ceppo *P.chlororaphis* PCL1391, gene codificante per un fattore trascrizionale appartenente alla famiglia di repressori TetR. È stato dimostrato che la proteina PsrA è responsabile dell'espressione del gene *rpoS*, codificante per il fattore σ^{38} responsabile, a sua volta, della trascrizione di geni legati alla fase stazionaria. Il gene *psrA* è stato identificato e caratterizzato in *Pseudomonas putida*, *P. areuginosa* e, recentemente, è stato identificato in *P. chlororaphis* PCL1391 ceppo di biocontrollo in cui il suddetto gene sembra influenzare in modo indiretto la produzione del composto fenazinico clororafina (fenazina-1-carbossiamide). PsrA è in grado di riconoscere una sequenza palindromica denominata "*psrA box*" (G/CTTTC-N₄₋₆-GAAAG/C) e il legame a tale sito consente l'attivazione dell'espressione del gene *rpoS*. Dati recenti hanno dimostrato che il fattore trascrizionale PsrA è responsabile in modo negativo della regolazione della sua stessa espressione; difatti, due "*psrA box*" sono presenti a monte del proprio codone di inizio.



PsrA protein *Pseudomonas chlororaphis*

Score = 451 bits (1159), Expect = 2e-125
 Identities = 234/235 (99%), Positives = 235/235 (100%), Gaps = 0/235 (0%)

```

Query   1      MAQSETVERILDAAEQLFAEKGFAETSLRLITSKAGVNLAAVNYHFGSKKALIQAVFSRF
60
Sbjct   1      MAQSETVERILDAAEQLFAEKGFAETSLRLITSKAGVNLAAVNYHFGSKKALIQAVFSRF
60

Query   61     LGPFCISLDRELERRSAKPDSKPSLEELLEILVEQALVVQPRSGNDLSIFMRLGLAFSQ
120
Sbjct   61     LGPFCVSLDRELERRSAKPDSKPSLEELLEILVEQALVVQPRSGNDLSIFMRLGLAFSQ
120

Query   121    SQGHLRRYLEDMYGKVFRRYMLLVNEAAPRIPIELFWRVHFMLGAAAFMSGIKALRAI
180
Sbjct   121    SQGHLRRYLEDMYGKVFRRYMLLVNEAAPRIPIELFWRVHFMLGAAAFMSGIKALRAI
180

Query   181    AETDFGVNTSIEQVMRLMVPFLAAGMRAETGVTDDAMATAQLKPRSKSTPAVAKA   235
Sbjct   181    AETDFGVNTSIEQVMRLMVPFLAAGMRAETGVTDDAMATAQLKPRSKSTPAVAKA   235

```

- ORF4 non ha esibito alcuna similarità con alcun gene o dominio proteico riportato nel database dell' NCBI.
- ORF5 ha presentato una omologia del 100% con il gene *lexA* di *P. chlororaphis*. In *Escherichia coli*, il prodotto genico di *lexA* è responsabile della repressione di diversi geni coinvolti nella risposta al danneggiamento del DNA, meccanismo denominato come "SOS Response". Tra questo pool genico vi è *recA* e lo stesso



gene *lexA*.

LexA repressor *Pseudomonas chlororaphis*

Score = 290 bits (743), Expect = 1e-77
 Identities = 145/145 (100%), Positives = 145/145 (100%), Gaps = 0/145 (0%)

```

Query   1      MTPGASRGIRIPGFEAKPDDSSLPIIGRVAAGAPILAEQHIEESCNINPAFFHPRADYLL   60
Sbjct  58      MTPGASRGIRIPGFEAKPDDSSLPIIGRVAAGAPILAEQHIEESCNINPAFFHPRADYLL
117

```

```

Query   61   RVHGMSMKDIGIFDGDLLAVHTTREARNGQVVVARIGDEVTVKRFKREGSKVWLIAENPE
120
Sbjct   118   RVHGMSMKDIGIFDGDLLAVHTTREARNGQVVVARIGDEVTVKRFKREGSKVWLIAENPE
177

Query   121   FAPIEVNLKDQDLVIEGLSVGVIRR   145
Sbjct   178   FAPIEVNLKDQDLVIEGLSVGVIRR   202

```

- ORF6 non ha presentato alcuna omologia con domini presenti nel database di ORF Finder mentre ha esibito una buona omologia di sequenza con un gene codificante per un inibitore di divisione cellulare identificato nel ceppo *Pseudomonas fluorescens* Pf01.

Cell division inhibitor *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1

```

Score = 48.1 bits (113), Expect = 2e-04
Identities = 22/28 (78%), Positives = 23/28 (82%), Gaps = 0/28 (0%)

Query   14   PXAPILKEVVESSWNXEPEAFSELSLXG   41
Sbjct   22   PLAPILKDVVERPWNTPEPEAFSELSLRG   49

```

- ORF7 ha presentato una buona omologia di sequenza con una regione codificante per un fattore proteico ipotetico identificato in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5.

Conserved hypothetical protein *Pseudomonas fluorescens* Pf-5

```

Score = 172 bits (437), Expect = 4e-42
Identities = 85/91 (93%), Positives = 90/91 (98%), Gaps = 0/91 (0%)

Query   1   MTDIIPAFRGEQTFMPTSFL EIVELPDGRIELRRAEDEGSLVTLDFSEDAKAFLQGQHVE
60
Sbjct   1   MTDIIPFRGDQTFMPTSFL EIVELPDGRIELRRAEDEGSLVTLDFSEDAKAFLQGQHVE
60

Query   61   VAKAMLSVGVMAGRLVEGELEKEEGPRILH   91
Sbjct   61   VAKAMLSVGVMAGRLVEGE++KE+GPR+LH   91

```

- ORF8 ha presentato una omologia di sequenza con un dominio LemA identificato in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. LemA è un acronimo usato precedentemente per indicare la proteina GacS , fattore proteico ben descritto nel genere *Pseudomonas*.



lemA protein *Pseudomonas fluorescens* Pf-5

Score = 106 bits (265), Expect = 4e-22
Identities = 51/84 (60%), Positives = 66/84 (78%), Gaps = 0/84 (0%)

```

Query   2   IILLTAILVAWLLWYYYNKIVGAGNRAQRAWADVLVYERQKIKVLDALEEQASSFKIYES
61
      ++L+ AI +  L + +YNKIVGA NRAQRAW+DVL Y+RQ+IKVLD LE Q + F+ YES
Sbjct   3   LLLVIAIALGVLAYVHYNKIVGAHNRAQRAWSDVLTYQRQRIKVLDMLEPQVAGFQAYES
62

Query   62  NVLEKVVGXRSALGRLPEAASGEA   85
      +LEK+VG RSA+G LP AA G+A
Sbjct   63  QLLEKIVGLRSAIGSLPSAADGDA   86

```

- ORF9 presenta una similarità del 41% con un fattore proteico ipotetico sequenziato in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, la cui funzione non è stata ancora caratterizzata. L'omologia di sequenza del 43% con un dominio proteico transmembrana identificato in *Idiomarina loihiensis* assume un aspetto interessante in virtù dei risultati ottenuti dal sequenziamento dell'ORF8.

hypothetical protein PFL_1945 *Pseudomonas fluorescens* Pf-5

Score = 71.6 bits (174), Expect = 1e-11
Identities = 36/86 (41%), Positives = 56/86 (65%), Gaps = 1/86 (1%)

```

Query   1   MACATFATPVTVLKLLQIAKELKDVSFEFSSQSRLCVSFNDDVVGIIATSAVSLAEPVAF
60
      +ACA FATP T+  LL++ + LK V+ EFSS+  LC+SF++ +V+      +  +  +F
Sbjct  182  LACAKFATPTTLAFLLELRRRLKKNLEFSSEGHLCLSFDDAEVMAYKDPG-TFDDLPSF
240

Query   61  HAGLMQGATMPRLRPVLELLHQFAEL   86
      +A + QG  +P L PVL L+H+ AEL
Sbjct  241  YANIEQGLPLPNLFPVLALVHELAEL   266

```

6. Clonaggio del gene *mtnP*

La presenza di un sito di restrizione *Bam*HI tra i geni ORF1 e ORF2 ha reso possibile excidere la regione che ha presentato omologia di sequenza con *mtnP* dal costrutto pPR510-RS1500 utilizzando la combinazione di enzimi *Eco*RI/*Bam*HI.

La regione di 519 bp è stata successivamente trasferita nel vettore pPR510 digerito con gli enzimi di restrizione *EcoRI* e *BamHI* generando il vettore pPR510-*mtnP*, che è stato di seguito sequenziato mediante l'uso dei primers M13. I risultati hanno confermato il grado di similarità precedentemente ottenuto nei sequenziamenti e che non vi sono stati mutazioni nella sequenza analizzata. La mancanza di 140 bp del gene *mtnP* ha rappresentato l'unica differenza presente con il vettore pPR510-RS1500.

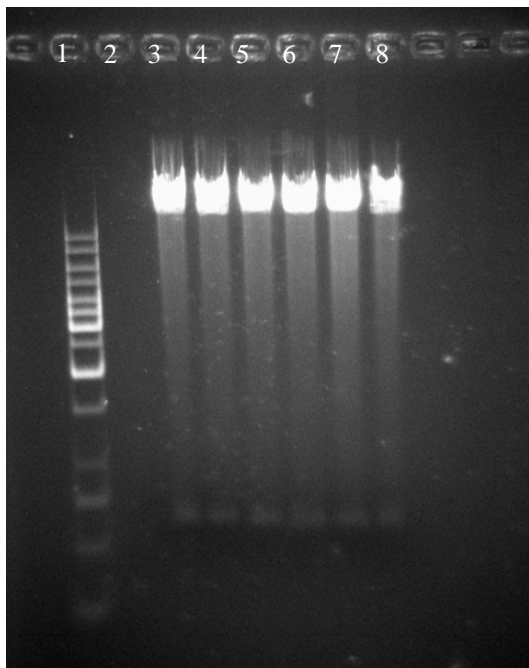


Foto 3.3.2 Vettore pLAF *mtnP*. Digestione di diversi vettori per constatare la presenza del frammento di 519 bp (pozzetti 3-8). Il ladder utilizzato in questa corsa elettroforetica è il 1Kb dell'Invitrogen (pozzetto1). Il pozzetto 2 costituisce il controllo negativo.

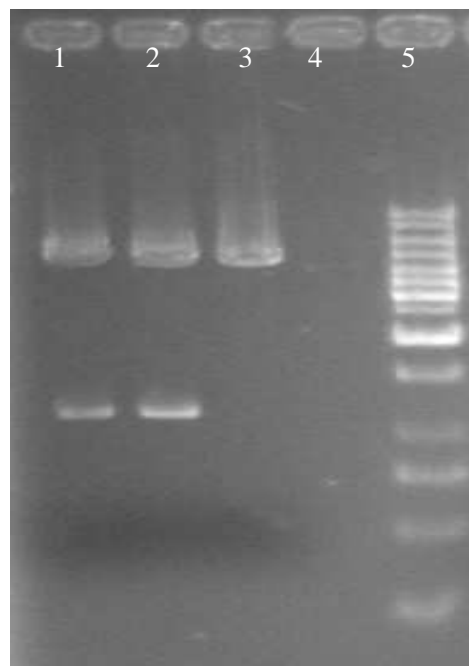


Foto 3.3.3 Vettore pPR510 *lexA*. Digestione di diversi vettori per constatare la presenza del frammento di 1000bp (pozzetti 1-3). Il pozzetto 4 costituisce il controllo negativo. Il ladder utilizzato in questa corsa elettroforetica è il 1Kb dell'Invitrogen (pozzetto5).

è stato successivamente trasferito in *E. coli* DH5 α e nel ceppo *P. aureofaciens* 30-84 wild type. Il fenotipo del wild type non è mutato con l'introduzione del suddetto plasmide. La sequenza nucleotidica presente tra i siti di restrizione *EcoRI* e *BamHI* del vettore pPR510-*mtnP* è stata successivamente trasferita nel cosmide pLAF3 digerito con i medesimi enzimi di restrizione, producendo il vettore pLAF *mtnP* (Foto 3.3.2), vettore che

7. Clonaggio del gene *lexA*

La coppia di primer denominata *lexA* è stata disegnata per amplificare una regione di 1000 paia di basi dal vettore pLAF-R5000. In tale sequenza nucleotidica è presente il gene *lexA* ed il suo probabile promotore. Il prodotto di amplificazione è stato eluito da gel

e successivamente digerito *EcoRI* e *BamHI* e trasferito nei vettori pPR510 e pLAFR3 digeriti con i medesimi enzimi. Nel corso della tesi è stato generato un vettore denominato pPR510 *lexA* (Foto 3.3.3), mentre al momento non è stato possibile generare un costrutto in cui il prodotto di amplificazione fosse stato introdotto nel cosmide pLAFR3.

8. Clonaggio del gene *psrA*

La coppia di primer indicate come *psrA* è stata disegnata per amplificare l'open reading frame di *psrA*, in modo tale che il prodotto di amplificazione non presentasse alcun “*psrA* box” nella sua sequenza nucleotidica. I prodotti di amplificazione (Foto 3.3.4) sono stati digeriti con gli enzimi *EcoRI* e *BamHI* e successivamente trasferiti in pPR510 digerito con gli stessi enzimi, generando così il vettore pPR510 *psrA*, utilizzato per verificare la sequenza del prodotto di amplificazione onde evitare eventuali mutazioni che potessero inficiare l'attività del prodotto genico.

Il frammento *EcoRI-HindIII* derivante dal vettore pPR510 *psrA* è stato clonato in pLAFR3, generando il cosmide pLAF *psrA*, che è stato trasferito in *E. coli* DH5a mediante trasformazione e quindi in *P. aureofaciens* 30-84 e alcuni dei suoi ceppi mutanti mediante triparental mating, al fine di determinare l'influenza della presenza di molteplici copie di *psrA* sulla biosintesi delle fenazine.

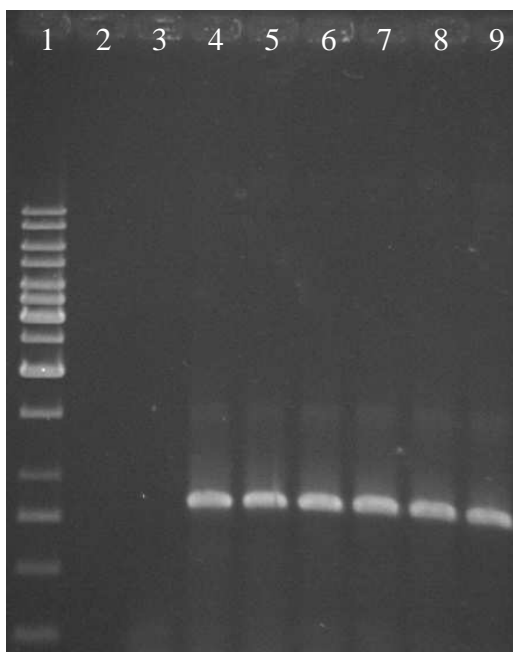


Foto 3.3.4 Prodotti di amplificazione utilizzando i primer *psrA*. Nei pozzetti 4-9 è il prodotto di amplificazione ottenuto usando pPR510 R5000 come template. I pozzetti 2 e 3 costituiscono i controlli negativi. Il ladder utilizzato in questa corsa elettroforetica è il 1Kb dell'Invitrogen (pozzetto1).

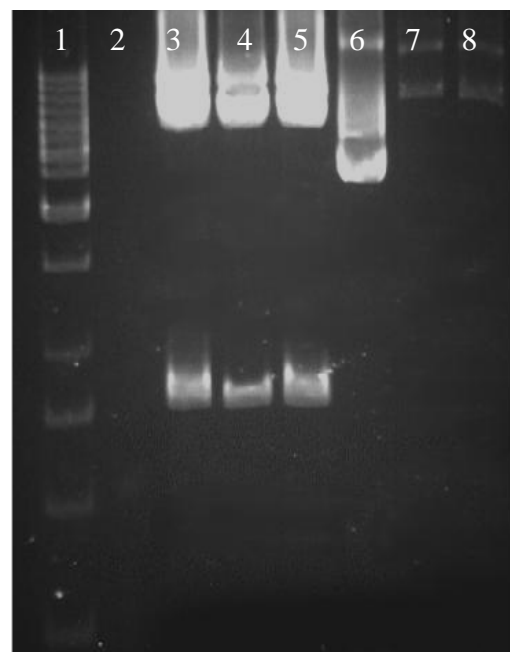


Foto 3.3.5 Vettore pPR510 *psrA*. Digestione di diversi vettori per constatare la presenza del frammento di 750 bp (pozzetti 3-8). Il pozzetto 2 costituisce il controllo negativo. Il ladder utilizzato in questa corsa elettroforetica è il 1Kb dell'Invitrogen (pozzetto1).

9. Interazione del gene *psrA* con la regolazione delle fenazine

La presenza di copie multiple del gene *psrA* ha influenzato la regolazione della biosintesi delle fenazine. Quando presente nel ceppo wild type *P. aureofaciens* 30-8,4, esso ha prodotto la riduzione drastica della produzione degli antibiotici fenazinicici, mentre, l'introduzione *in trans* del plasmide pLAF *psrA* nel ceppo mutante *P. aureofaciens* 30-84 RpeA⁻ ha comportato l'incremento della produzione di fenazine come è possibile notare nella foto seguente (Foto 3.3.6).

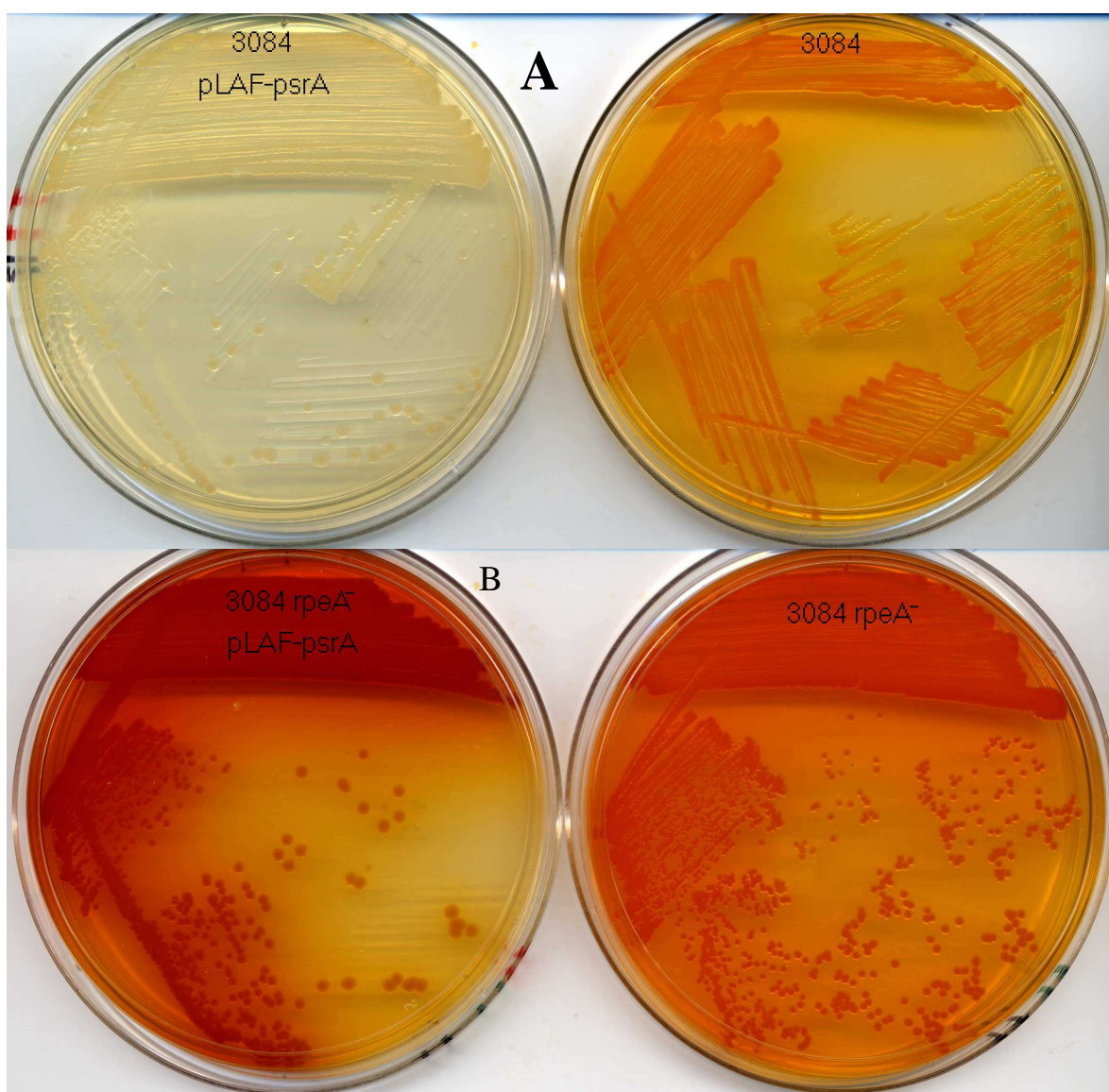


Foto 3.3.6 Fenotipi prodotti dall'introduzione dei vettori pLAF *psrA* nel ceppo *P. aureofaciens* 30-84 wild type (A) ed il ceppo mutante *P. aureofaciens* 30-84 RpeA⁻ (B).

La produzione di fenazine è incrementata anche nel momento in cui il costrutto pLAF *psrA* è stato mobilizzato nel ceppo mutante mancante di un fattore sigma 70 funzionale (*rpoS*), mentre non è stato evidenziato alcun cambiamento nella produzione di fenazine allorquando il ceppo *P. aureofaciens* 30-84W (*gacA*) è stato trasformato con il suddetto cosmide.

Tutti i ceppi mutanti prodotti all'interno di questo lavoro sono stati saggiati anche per la produzione di metaboliti secondari quali l'acido cianidrico e le proteasi. La presenza di copie multiple del gene *psrA* non ha influenzato la produzione dei metaboliti secondari saggiati, come messo in evidenza nelle foto 3.3.7 e 3.3.8.

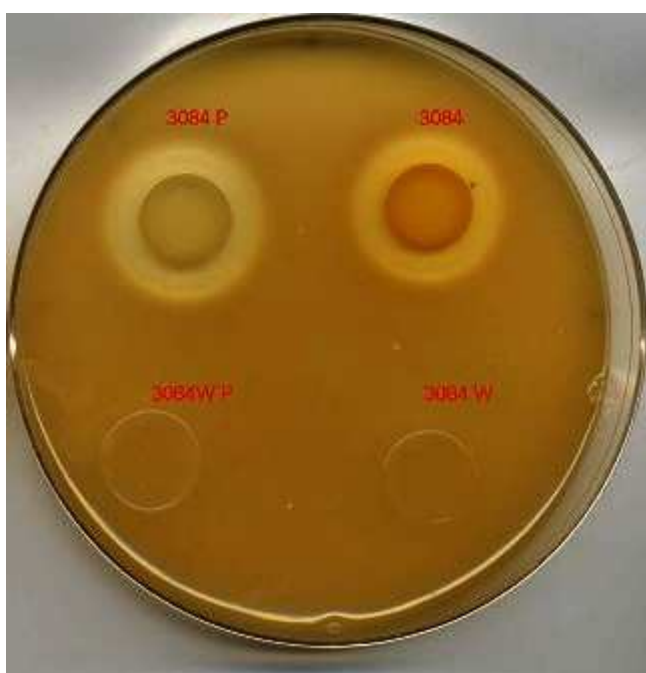


Foto 3.3.7 Attività proteasica nei ceppi *P. aureofaciens* 30-84 wild type ed il ceppo mutante *P. aureofaciens* 30-84 W trasformati con il cosmide pLAF *psrA*, ceppi 3084P e 308WP rispettivamente.

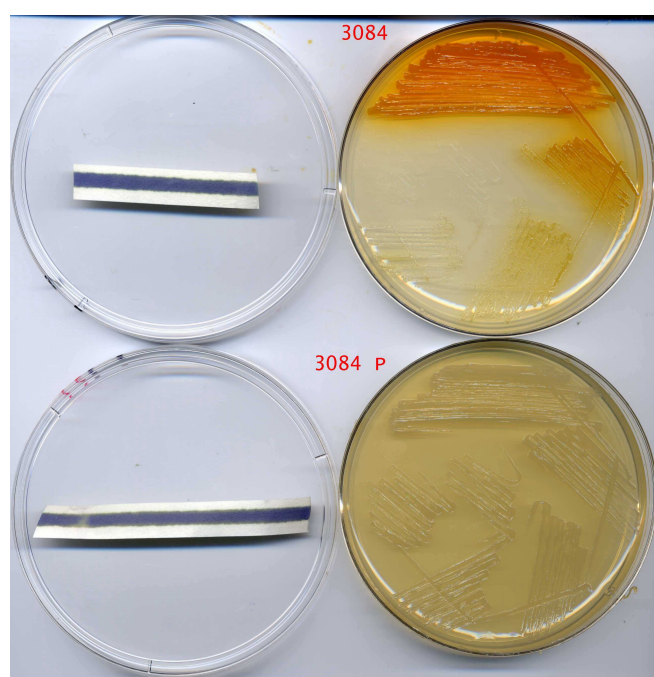


Foto 3.3.8 Produzione di HCN nel ceppo *P. aureofaciens* 30-84 wild type trasformato con il cosmide pLAF *psrA* (30-84 P).

10. Effetto di pLAF *psrA* su la trascrizione di *rsmZ*

Nel corso del lavoro è stata verificata l'ipotesi che *psrA* possa influenzare la trascrizione del mRNA regolatorio denominato *rsmZ*, dal momento che una sequenza simile al “*psrA* box” è stata identificata a monte del codone di inizio di *rsmZ*. Il plasmide reporter pKT2-PrsmZ, generato in un lavoro precedente, è stato utilizzato con il fine di verificare l'effetto di copie multiple del cosmide pLAF *psrA* sull'attività del promotore di

rsmZ, che nel plasmide, come illustrato in figura 3.3.1 è stato clonato a monte del gene *lacZ*.

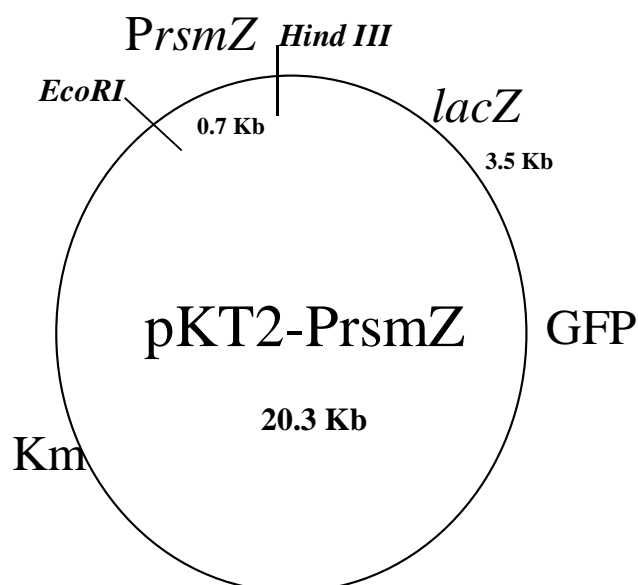


Fig. 3.3.1 Vettore pKT2-PrsmZ

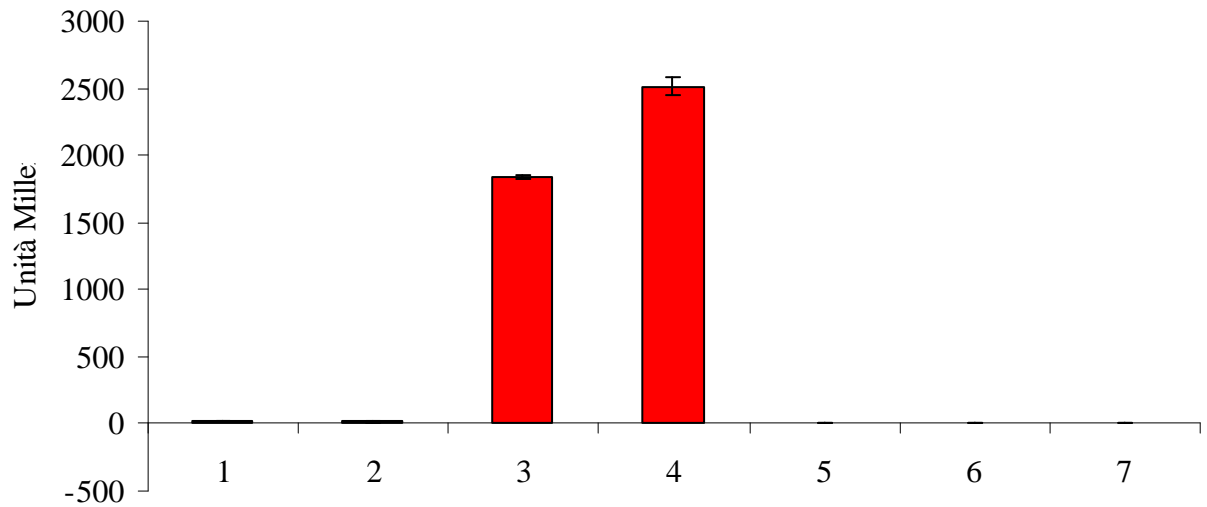
La regione carbossiterminale di *psrA*, mancante del dominio adibito al riconoscimento della regione nucleotidica, è stata amplificata mediante PCR utilizzando la coppia di primer *psrAC1* e *psrAC2*. I prodotti di amplificazione sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione *EcoRI* e *BamHI* e successivamente sono stati trasferiti nei vettori pPR510 e pLAFR3, digeriti a loro volta con i medesimi enzimi di restrizione.

Il vettore pLAF-*psrACter* è stato mobilizzato nel ceppo *P. aureofaciens* 30-84 con il fine di verificare l'effetto della regione carbossiterminale di *psrA* sulla biosintesi delle fenazine. Come è stato ipotizzato la regione carbossiterminale di *PsrA* non è stato in grado di inibire la produzione degli antibiotici fenazinici

I cosmidi pLAF *psrA* e pLAF *psrACter* sono stati trasferiti nei ceppi reporter *P. aureofaciens* 30-84 Ice (*phzB::inaZ*) in *P. aureofaciens* 30-84 W (*GacA*⁻) entrambi trasformati con il vettore reporter pKT2-PrsmZ. A sua volta il vettore reporter pKT2-PrsmZ presente in trans nel ceppo DH5α pKT2-PrsmZ è stato mobilizzato nel ceppo *P. aureofaciens* 30-84 trasformato con il plasmide pLAF *psrA*.

La presenza di copie multiple del cosmide pLAF *psrA* in *trans* nel ceppo *P. aureofaciens* 30-84 Ice pKT2-PrsmZ e nel ceppo di nuova formazione *P. aureofaciens* 30-84 pLAF *psrA* / pKT2-PrsmZ ha indotto un incremento nell'attività del promotore di *rsmZ*. Allo stesso momento non è stata registrata alcuna attività galattosidasica allorquando i due vettori sono stati mobilizzati nel ceppo *P. aureofaciens* 30-84 W (Tab. 3.3.4), ma in

modo interessante la presenza di *psrA* in trans induceva un incremento nell'attività della proteina GFP, come evidenziato nella foto 3.3.9.



Trattamenti			
N°	Trattamenti	Unità Miller	Errore Standard
1	30-84 Ice pKT2-PrsmZ	16	2
2	30-84 Ice pKT2-PrsmZ/pLAF-psrACter	18	7
3	30-84 Ice pKT2-PrsmZ/pLAF-psrA	1837	14
4	30-84 pKT2-PrsmZ/pLAF-psrA	2514	70
5	30-84 W pKT2-PrsmZ	0	1
6	30-84 W pKT2-PrsmZ/pLAF-psrACter	5	0
7	30-84 W pKT2-PrsmZ/pLAF-psrA	8	4

Tab. 3.3.4 Effetto del cosmide pLAF *psrA* sull'attività del promotore di *rsmZ* in diversi ceppi di *P. aureofaciens*.

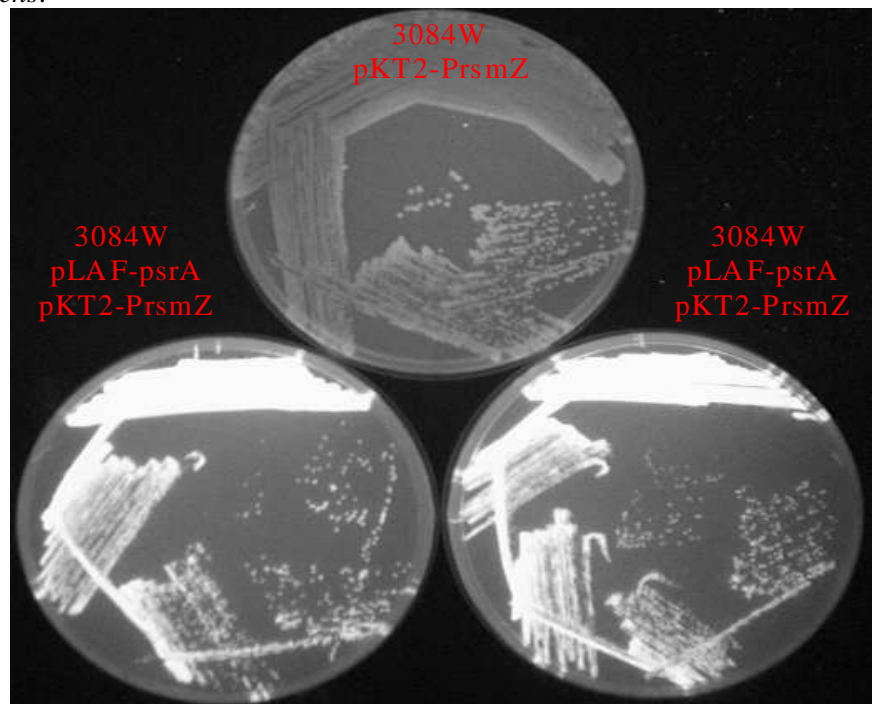


Foto 3.3.9 Attività GFP nel ceppo *P. aureofaciens* 30-84 W con pLAF *psrA* e pKT2-PrsmZ entrambi in *trans*.

11. Mutagenesi del plasmide pPR510 R5000

Durante il corso del lavoro di tesi è stato effettuato un approccio di mutagenesi del plasmide pPR510 R5000 mediante l'uso del kit EZ-Tn5™ <Kan-2> Insertion Kit, con il fine di silenziare i diversi geni localizzati sulla regione di 5000 paia di basi clonata nel sito *EcoRI* del vettore pPR510.

Sono state isolate diverse colonie di DH5a resistenti sia a cloramfenicolo che a kanamicina, le quali hanno presentato un frammento di 6 Kb clonato nel sito *EcoRI* del vettore pPR510, frutto della trasposizione del gene conferente resistenza alla kanamicina all'interno dell'inserto derivante dall'analisi del cosmide pLAF 13-6 (foto 3.3.10).

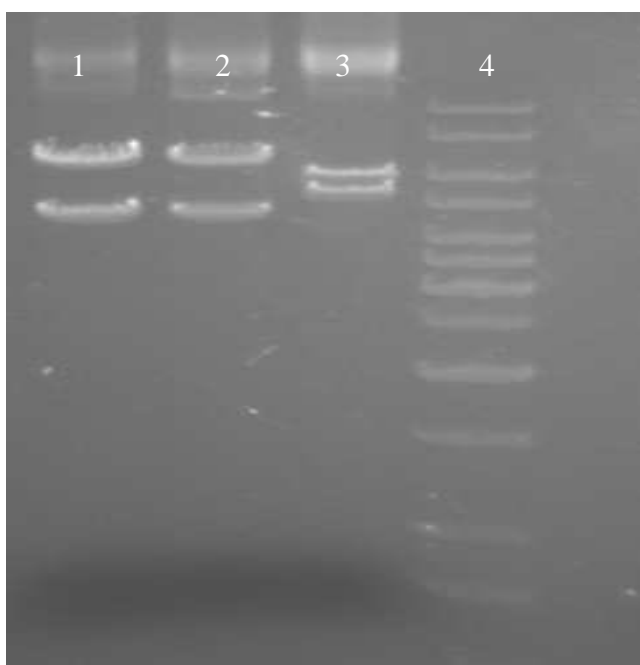
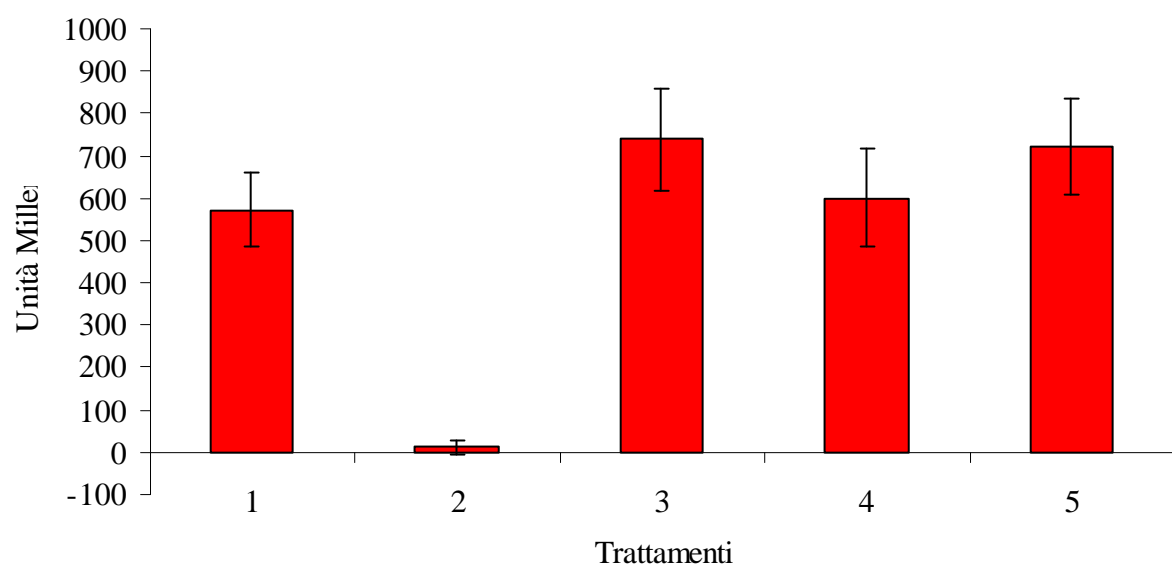


Foto 3.3.10 Vettori analizzati per la presenza del trasposone Tn5 <Kan-2> all'interno della regione di 5Kb del vettore pPR510 R5000 (pozzetti 1-3). Il ladder utilizzato in questa corsa elettroforetica è il 1Kb dell'Invitrogen (pozzetto4).

Il frammento di 6000 bp è stato eluito e purificato dal gel di agarosio e clonato nel cosmide pLAFR3 digerito con *EcoRI*, e quindi trasferito nel ceppo DH5α di *Escherichia coli*, generando colonie resistenti sia a kanamicina che a tetraciclina. I vettori creati sono stati mobilizzati nel ceppo reporter *P. aureofaciens* 30-84 ZN e i ceppi selezionati sono stati saggiati per determinare l'attività galattosidasi (Tab. 3.3.5).



N°	Trattamenti	Unità Miller	Errore Standard
1	30-84 ZN pLAFR3	572	86
2	30-84 ZN pLAF R5000 Tn2a	11	15
3	30-84 ZN pLAF R5000 Tn2b	738	121
4	30-84 ZN pLAF R5000 Tn4a	601	116
5	30-84 ZN pLAF R5000 Tn4b	720	113

Tab.3.3.5 Effetto della regione R5000 mutagenizzata con il trasposone Tn5 *psrA* sull'attività galattosidasi nel ceppo reporter *P. aureofaciens* 30-84 ZN.

I risultati ottenuti nei ceppi *P. aureofaciens* 30-84 ZN Tn2a e Tn2b, entrambi derivanti dalla stessa reazione di mobilizzazione del cosmidi, sono statisticamente differenti e allo stesso tempo non possono avere una interpretazione corretta. La perdita dell'attività inibitoria registrata nei ceppi *P. aureofaciens* 30-84 ZN Tn4a e Tn4b ha comportato il sequenziamento della regione mutata utilizzando primer forniti dal EZ-Tn5TM <Kan-2>Insertion Kit. I risultati del sequenziamento ha evidenziato che in entrambe i ceppi batterici il trasposone si è posizionato in una regione giacente tra gli open reading frame 9 e 8, quest'ultima, in modo molto interessante, ha presentato un'omologia di sequenza con il dominio LemA, altrimenti detto GacS, proteina facente parte di sistemi di trasduzione del segnale responsabile dell'attivazione e regolazione di diversi metaboliti secondari, tra cui le fenazine.

Capitolo IV

Conclusioni

Nell'ultimo mezzo secolo la ricerca e l'attività agricola sono state fortemente orientate verso il preliminare obiettivo di esaltare al massimo il livello produttivo delle colture. In questo contesto scarsa considerazione è stata attribuita a forme di difesa fitosanitaria alternative ai metodi di lotta classici, basati sull'utilizzo dei fitofarmaci. Tale atteggiamento negli ultimi anni è mutato, sia da parte dei ricercatori, che da parte degli operatori agricoli, in seguito ad un movimento di opinione che ha attraversato diversi strati sociali. I consumatori sono diventati più attenti alla qualità dei cibi che acquistano e i prodotti che offrono garanzie a tal proposito sono di gran lunga preferiti. Sistemi di agricoltura ecocompatibili (biologico, integrato) possono risultare, quindi, molto utili non solo per difendere la salubrità degli agroecosistemi, ma anche per ampliare e migliorare le prospettive di guadagno dei produttori agricoli. In questo quadro ricerche mirate ad individuare nuovi sistemi o agenti di controllo biologico assumono una notevole rilevanza.

La biodiversità è di importanza fondamentale in qualsiasi tipo di controllo biologico, non solo per favorire il mantenimento di equilibri acquisiti che sopprimono naturalmente l'insorgere di malattie, ma anche per selezionare ceppi di microrganismi antagonisti. Batteri appartenenti al gruppo degli pseudomonadi fluorescenti hanno ottenuto ottimi risultati quando utilizzati come biofitofarmaci (Ching-A-Woeng *et al*, 2003) per cui in questo lavoro di tesi si è cercato di individuare specie o biovar potenzialmente utilizzabili nel controllo biologico. Dei 112 isolati, 30 sono risultati afferenti al raggruppamento degli pseudomonadi fluorescenti. Il confronto e l'elaborazione dei risultati ottenuti con i diversi metodi d'identificazione (Test classici, API 20 NE, BIOLOG) hanno permesso di fornire un inquadramento tassonomico chiaro degli isolati.

Le reazioni e le assimilazioni dimostrate verso diversi composti, da parte degli isolati saggiati con i test classici, sono state messe in relazione con i dati riportati nel "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". I profili ottenuti non in tutti i casi risultavano essere identici a quelli riportati nel manuale, ma fissato un

certo limite di variabilità, le identificazioni derivanti da essi sono state ritenute valide. Un differente comportamento nell'assimilazione di un determinato glucide è stato interpretato come la capacità dell'individuo di potersi adattare alle opportunità ecologiche fornitegli dall'ambiente. E' stato infatti dimostrato da molti studi come ambienti eterogenei determinino, nell'ambito del genere *Pseudomonas*, l'insorgenza di genotipi specializzati per determinate nicchie ecologiche (Rainey e Travisano, 1988). Questo comportamento, insieme alla competizione e ad una serie di fattori genetici (mutazione, ricombinazione e così via), sono i motivi che determinano l'evoluzione delle popolazioni batteriche. Nel caso specifico essi risultano essere causa dell'elevata diversità riscontrabile nell'ambito del genere *Pseudomonas* (Spiers *et al*, 2000). Il ricorso ai test classici ha permesso di attribuire ad ogni isolato una propria collocazione tassonomica.

Il sistema API 20 NE permette di identificare gli isolati batterici in funzione del loro profilo biochimico. I vantaggi del metodo sono:

- Attendibilità nella classificazione delle specie batteriche.
- Rapidità, economicità e semplicità di attuazione.

Gli svantaggi del sistema sono invece:

- Mancata identificazione di alcune specie, come nel caso di *Pseudomonas aureofaciens*. L'API 20 NE viene utilizzato prevalentemente per effettuare diagnosi in ambito clinico per cui i profili biochimici dei batteri non patogeni per l'uomo non sono riportati nella sua banca dati.

- Insufficienza del metodo nella discriminazione tra le differenti biovar afferenti alla specie *P. fluorescens*.

Il dendrogramma ottenuto dall'elaborazione statistica dei dati forniti dal test API 20 NE permette di osservare la formazione di gruppi in cui sono riuniti batteri afferenti ad una determinata specie insieme al ceppo di riferimento (es: isolati di *P. fluorescens* bio I appartengono allo stesso cluster di *P. fluorescens* bio I ceppo 5916). Tali risultati confermano l'attendibilità del metodo.

Il sistema BIOLOG permette l'identificazione delle specie microbiche attraverso la definizione di un profilo nutrizionale. I vantaggi del metodo sono:

- Attendibilità nella classificazione delle specie batteriche.
- Rapidità del sistema.

- Possibilità di tracciare un profilo nutrizionale dei singoli individui preciso, in quanto vengono saggiate contemporaneamente 95 differenti fonti di carbonio.

Gli svantaggi del metodo sono:

- Utilizzo di un sistema di classificazione confuso nell'ambito del raggruppamento degli pseudomonadi fluorescenti. Il data-base del BIOLOG test, infatti, fa riferimento a differenti criteri tassonomici.

- Errata identificazione della specie *Pseudomonas fluorescens* che viene spesso identificata come *Pseudomonas tolaasii*. In questo caso si può ipotizzare una carenza nel numero di ceppi utilizzati per la definizione dei profili inseriti nella banca dati come riferimenti.

- La lettura dei dati necessita di operatori che abbiano una certa familiarità con il metodo.

- Il metodo è economicamente oneroso.

Il dendrogramma ottenuto dall'elaborazione statistica delle reazioni delle piastre BIOLOG è molto confuso. Esso non permette di articolare particolari considerazioni se non che i ceppi di riferimento delle collezioni internazionali, inseriti per confronto, sono raggruppati all'interno dello stesso cluster completamente distaccato dai nostri isolati. Anche questo è indice dell'estrema variabilità delle popolazioni degli pseudomonadi fluorescenti.

Il ricorso alla metodica molecolare per l'identificazione delle specie è già in uso da parecchi anni e per diverse entità batteriche (Weisburg *et al*, 1991). I vantaggi della PCR-RFLP sono:

- Identificazione precisa nell'ambito delle specie di *Pseudomonas*.
- Economicità rispetto ai metodi biochimici.
- Gli svantaggi della tecnica PCR-RFLP sono:
 - Mancata identificazione delle biovar o biotipi di *P. fluorescens*.
 - Laboriosità del metodo
 - Necessità di tecnici capaci di eseguire ed interpretare i risultati del sistema.

Il dendrogramma derivato dall'elaborazione dei profili di restrizione permette di visualizzare dei raggruppamenti assimilabili a quelli ottenuti con l'elaborazione dei risultati dell'API 20 NE, fornendo buone indicazioni anche sulle biovar. La tecnica della PCR-RFLP permette infatti di mettere insieme i diversi ceppi della

collezione con i riferimenti così da distinguere nettamente le biovar I, III e V di *P. fluorescens*.

In definitiva l'identificazione dei nostri isolati è stata possibile integrando le classificazioni fornite da ciascun metodo e interpretando le informazioni ottenute mediante l'analisi dei risultati ottenuti dai diversi sistemi di identificazione.

I saggi *in vitro* hanno permesso di individuare i 14 ceppi che hanno maggiormente evidenziato attività di antibiosi contro i fitopatogeni *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, , *Rhizoctonia solani*, *Phytium ultimum*.

La caratterizzazione è stata effettuata contro questi miceti in modo da poter ipotizzare quali siano meccanismi che permettono a questo gruppo di batteri di poter esercitare attività antagonista. La caratterizzazione si è basata sull'accertamento della produzione di alcuni metaboliti secondari quali siderofori e chitinasi. L'attività di antibiosi dei nostri isolati può essere riassunta nel seguente schema:

Ceppi	Produzione di siderofori	Produzione di chitinasi
Mipaf 26	+	-
Mipaf 62	+	-
Mipaf 71	+	-
Mipaf 72	+	-
Mipaf 73	+	-
Mipaf 80	+	-
Mipaf 114	+	-
Mipaf 116	+	-
Mipaf 117	+	-
Mipaf 118	+	-
Mipaf 119	-	-
Mipaf 120	+	-
Mipaf 121	+	-
Mipaf 122	+	-

Si può supporre che alcuni batteri attivino contemporaneamente più meccanismi per poter prevalere sui funghi fitopatogeni. L'M119 è l'unico ceppo che non produce nessuno di questi metaboliti e la cui attività di antibiosi potrebbe essere connessa alla produzione di antibiotici o enzimi litici (glucanasi, cellulasi, emicellulasi). L'analisi congiunta dei risultati delle prove *in vitro* e della caratterizzazione metabolica indica che i ceppi più attivi sono quelli produttori di fenazine.

La produzione delle fenazine è stata finora caratterizzata in diversi ceppi batterici, quali *Pseudomonas fluorescens* 2-79 (Thomashow et al., 1989)

Pseudomonas chlororaphis PCL1391 (Bloemberg *et al.*,) ed infine *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 (Pierson e Thomashow, 1992). Gli studi effettuati su quest'ultimo ceppo batterico hanno permesso di evidenziare la complessità dei meccanismi molecolari tesi alla regolazione della produzione dei composti fenazinici. La caratterizzazione di tali meccanismi ha lo scopo di ottimizzare l'impiego di ceppi batterici afferenti alla specie *P. aureofaciens* nel controllo biologico di funghi fitopatogeni.

La produzione di fenazine è la risultante di una comunicazione intraspecifica mediata attraverso la sintesi di piccole molecole segnali che nel caso del ceppo *P. aureofaciens* 30-84 sono esanoil omoserina lattoni. Tali molecole segnali una volta raggiunta una concentrazione soglia o quorum, portano all'attivazione di un fattore trascrizionale responsabile dell'attivazione della trascrizione dell'operone delle fenazine (*phzXYFABCD*) (Pierson *et al.*, 1994; Pierson *et al.*, 1995; Wood *et al.*, 1997).

Parte dello studio ha avuto come obiettivo la caratterizzazione della regione intergenica compresa tra il gene *phzR* ed il gene *phzX*, andando ad evidenziare quali regioni *in cis* siano coinvolte nella trascrizione del suddetto operone. La regione di circa 800 paia di basi è stata suddivisa mediante PCR e digestioni enzimatiche in differenti frammenti, che sono stati inseriti indipendentemente a monte di un gene reporter (*lacZ* o *uidA*) per constatare quale di queste consentiva la trascrizione di tali geni.

Nella prossimità del codone di inizio del gene *phzX* sono state identificate le più comuni sequenze consenso necessarie per la trascrizione, quali la posizione - 35 il TATAA Box riconosciute dalla subunità sigma della RNA polimerasi, ed anche il dominio Shine e Dalgarno necessario per il riconoscimento della molecola ribonucleotidica nascente da parte dei ribosomi. Tali sequenze consenso non sono state riscontrate nella parte di regione genomica prossima al codone di inizio di *phzR*.

Dal lavoro svolto è stato verificato che l'attività trascrittoria dei geni reporter aumenta in modo sensibile allorquando la regione analizzata è mancante delle sequenze nucleotidiche appartenenti all'open reading frame di *phzR*. I frammenti di amplificazione F1R1 e F1R2, che includono soltanto parte della regione prossima a *phzX*, inducono un incremento delle unità di betagalattosidasi prodotte pari a 5 volte le unità prodotte nel momento in cui la regione intergenica intera è stata clonata a monte del gene reporter *lacZ*. Ciò può essere dovuto o alla eliminazione nei

frammenti F1R1 e F1R2 di una sequenza *in cis* riconosciuta da un fattore trascrizionale che va ad influenzare negativamente il riconoscimento del promotore da parte di PhzR oppure alla assunzione di una determinata struttura della regione intergenica che non consente il legame di PhzR alla sequenza consenso.

Nel lavoro svolto è stato possibile individuare la sequenza consenso riconosciuta da PhzR mediante l'analisi del frammento F3R1. Tale sequenza è mancante della metà di una regione palindromica centrata nel sito di restrizione di *BglII* e che va a sovrapporsi alla regione -35 deputata al legame con il fattore sigma della RNA polimerasi. La mancanza di tale sequenza comporta la drastica riduzione della produzione di unità Miller allorché il frammento F3R1 è posizionato a monte del gene *lacZ*. Le unità prodotte sono di gran lunga inferiori alla quantità prodotta nel caso in cui il suddetto gene reporter è controllato dall'intera regione intergenica. I dati fanno supporre che la regione analizzata sia riconosciuta da PhzR e quindi che sia di fondamentale importanza nella trascrizione dell'operone delle fenazine. In base a tali risultati la regione centrata in posizione -60 (CACTACAAGATCTGGTAGT) è stata denominata "phz box".

Nel frammento F2R1 è stata distrutta una seconda regione palindromica (GCGGGCTGCAGCCAGCCCGC) centrata nel sito di restrizione di *PstI* localizzata in posizione -93 da *phzX*, onde poterne valutare l'effetto sulla trascrizione dell'operone delle fenazine. Durante il lavoro di tesi non è stato possibile costruire un vettore reporter in cui il suddetto frammento fosse posizionato a monte del gene *lacZ*, sebbene il prodotto di amplificazione sia stato ottenuto senza problemi di sorta. La caratterizzazione di questo frammento nucleotidico è interessante in quanto sarebbe possibile ridurre ulteriormente la regione nucleotidica deputata all'attivazione della trascrizione dell'operone delle fenazine.

La differenza minima nella produzione di unità Miller tra i frammenti F1R1 e F1R2 lascia ipotizzare che la regione localizzata tra la posizione -33 e la posizione +94, caratterizzata da un alto contenuto purinico (adenina e timina), non giochi un ruolo importante nella trascrizione dell'operone delle fenazine. Una ulteriore prova che tale regione non sia coinvolta in una regolazione della trascrizione potrebbe derivare dallo studio dell'attività di un promotore costitutivo seguito da tale regione ad alto contenuto purinico.

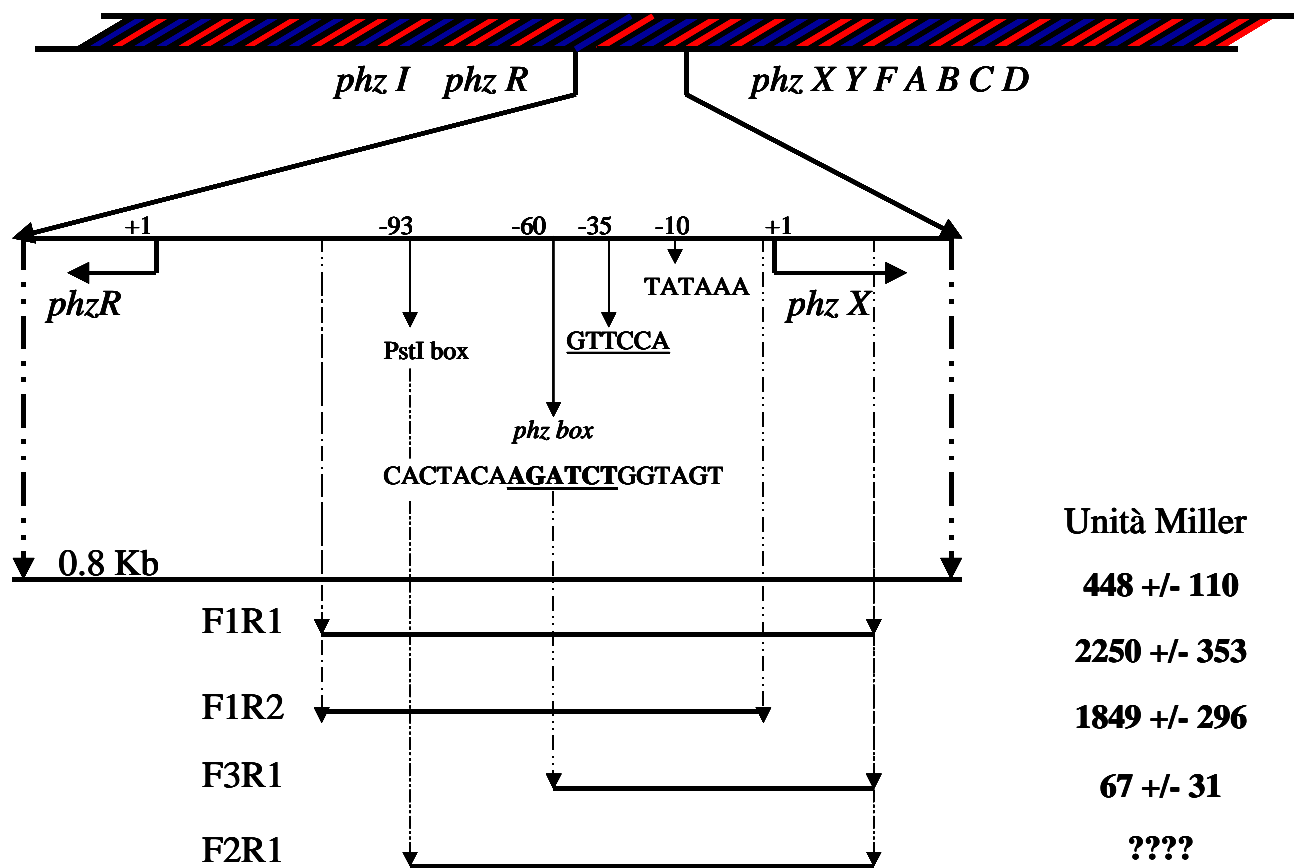


Fig. 4.1 Attivazione del gene *lacZ* in presenza di diversi frammenti derivanti dalla regione nucleotidica presente tra *phzR* e *phzX*.

L'importanza del fenomeno del quorum sensing è stata dimostrata introducendo vettori reporter in cui il gene *uidA* era governato dal frammento F1R1 o F1R2 *in trans* nei ceppi *P. aureofaciens* 30-84I e *P. aureofaciens* 30-84R, rispettivamente mancanti di *phzI* e *phzR*. In entrambi i casi non è stata riscontrata alcuna attività del gene reporter pertanto è possibile concludere che l'attivazione del promotore dell'operone delle fenazine è strettamente legata alla presenza di fattori proteici PhzI e PhzR entrambi funzionali.

La biosintesi delle fenazine ed il fenomeno del quorum sensing sono controllati da due sistemi di trasduzione del segnale quali il ben noto GacS/GacA (Chancey *et al.*, 1999) e il sistema di cui fa parte RpeA (Whistler *et al.*, 2003).

Il ceppo *P. aureofaciens* 30-84 W è mancante di un sistema GacS/GacA funzionale e pertanto non è capace di produrre fenazine. La mobilitazione in tale ceppo mutante del vettore reporter pKT2 F1R2-lacZ Tc^R ha permesso di evidenziare come la mancanza del fattore GacS/GacA possa inficiare l'attivazione del promotore dell'operone delle fenazine. La mancanza del fattore GacA è traducibile in una riduzione di circa venti volte nella produzione di unità Miller; questa drastica diminuzione sarebbe ascrivibile alla riduzione della sintesi di molecole segnale come dimostrato da Chancey *et al.*, (1999) oppure ad una interazione diretta di GacA con il promotore dell'operone *phzXYFABCD*.

Il vettore pKT2 F1R2-lacZ Tc^R è stato introdotto *in trans* anche nel ceppo mutante *P. aureofaciens* 30-84 RpeA, in cui il gene *rpeA* è stato distrutto mediante ricombinazione omologa. Tale ceppo mutante produce una maggior quantità di fenazine ed ha la capacità di produrre tali molecole antibiotiche anche quando allevato su substrati poveri laddove il ceppo wild type è incapace di produrne. L'attività betagalattosidasi è risultata maggiore nel ceppo 30-84 RpeA che nel ceppo 30-84 Ice (*phzB::inaZ*) confermando che RpeA sia responsabile di un controllo negativo della espressione delle fenazine (Whistler *et al.*, 2003). Tali dati sono stati confermati anche utilizzando il vettore reporter pKT2 F1R2-*uidA-cat-lacZ* mobilitato nel ceppo mutante *P. aureofaciens* 30-84 RpeA ZN (*phzB::lacZ*) in cui l'attività glucoronidasica ha raggiunto valori maggiori di cinque volte a quelli ottenuti nel ceppo 30-84 Ice addizionato con lo stesso vettore.

La produzione di fenazine è regolata da altri fattori quali RpoS e il sistema di regolazione posttrascrizionale RsmA/*rsmZ*, ma sono presenti diverse regioni

genomiche di *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 che sebbene inducano cambiamenti nella regolazione della biosintesi delle fenazine non sono state ancora caratterizzate. Una di queste regioni è stata clonata nel cosmide pLAF 13-6 ed è stata caratterizzata nel corso del presente studio.

La successione di diverse reazioni di restrizione del cosmide pLAF 13-6 e la successiva analisi dei frammenti ottenuti ha portato all'identificazione di una regione genomica di 5000 paia di basi aventi un'attività inibitoria sulla produzione di fenazine. L'introduzione di tale regione *in trans* mediante l'uso del cosmide pLAF R5000 produceva una riduzione nell'attività galattosidasi nel ceppo *P. aureofaciens* 30-84 ZN ed una mancata produzione di fenazine accompagnata da una riduzione nell'accrescimento nel ceppo wild type.

La successiva analisi della suddetta regione genomica mediante analisi di restrizione ha comportato la suddivisione di esso in 3 frammenti di 450, 1500 e 3000 bp e dalla loro analisi non è stata evidenziata alcuna attività inibitoria sull'attività galattosidasi nel ceppo 30-84 ZN. I tre frammenti di restrizione sono stati prodotti mediante digestione con l'enzima *Sall*, pertanto è stato ipotizzato che un sito di taglio fosse presente nel gene responsabile della inibizione della trascrizione del costrutto genico *phzB::lacZ*.

Uno dei due siti di taglio di *Sall* è presente tra gli open reading frames 8 e 9 che presentavano rispettivamente una omologia con LemA (GacS) e con un dominio proteico transmembrana. L'ipotesi che la distruzione di un gene avente omologia di sequenza con *gacS* possa aver annullato l'attività negativa del cosmide pLAF R5000 è stata verificata mediante l'analisi di trasformazioni effettuate utilizzando il EZ-Tn5TM <Kan-2>Insertion Kit.

L'inserzione del trasposone Tn5 in una regione compresa tra i ORFs 8 e 9 ha prodotto risultati simili a quelli ottenuti con la semplice digestione del frammento di 5000 bp con l'enzima *Sall*. É molto probabile che ORF8 e ORF9 codifichino per una proteina avente funzioni simili a GacS e ,quindi, la sua presenza possa in un modo indiretto alterare i pathway metabolici del ceppo 30-84 riducendo la produzione di fenazine. Per poter verificare le suddette ipotesi sarà clonata via PCR la regione identificata come ORF8 e ORF9 e trasferita *in trans* sia nel ceppo *P. aureofaciens* 30-84 ZN sia nel ceppo wild type onde verificare come e se queste due regioni sono in grado di modificare l'espressione dell'operone delle fenazine.

Come detto precedentemente, nessuno dei tre frammenti derivanti da pLAF R5000 produceva riduzione nella attività galattosidasica nel ceppo reporter 30-84 ZN anzi, in modo sorprendente, il frammento di 1500 paia di basi clonato nel cosmide pLAF RH1500 induceva un aumento nella produzione di fenazine quando introdotto *in trans* nel ceppo wild type. Il ceppo wild type recante copie multiple del suddetto costruito presentava la capacità di produrre fenazine su substrati poveri, quali l'M9 a differenza del ceppo wild type.

Il sequenziamento ha portato all'identificazione di due open reading frames aventi entrambi una funzione di razionalizzazione dell'energia metabolica. Infatti ORF1 codificava per una nucleoside fosforilasi già caratterizzata in *P. aeruginosa* nel lavoro di Sekowska A. *et al.*, (2004). Tale gene appartiene ad un pathway metabolico interessato nella metabolizzazione della metionina, denominato "Methionine Salvage". La riutilizzazione della metionina comporta un incremento della S- adenosil metionina altrimenti detta SAM, che rappresenta il substrato da cui prende inizio la sintesi delle molecole segnali ovvero le N- acil-omoserina lattoni. Un incremento nella produzione di molecole segnali potrebbe ridurre il tempo di riconoscimento del fattore trascrizionale PhzR e pertanto ridurre il tempo necessario per l'inizio della sintesi delle fenazine.

Per quanto concerne ORF2 esso codifica per una N-acetil glucosamminidasi denominata NagZ, che dal lavoro di Park *et al.*, (2001) è stato ricondotto al pathway metabolico collegato alla riutilizzazione dei componenti della parete cellulare (Cell Wall Recycling). È stato ipotizzato che il risparmio energetico dovuto all'introduzione di tale enzima associato al risparmio energetico derivante dalla riutilizzazione della metionina conferisce alla cellula batterica una maggiore capacità energetica tale da garantire la produzione di un metabolita secondario. Il frammento genico compreso tra i siti di taglio *EcoRI* e *BamHI* del cosmide pLAF RH1500 è stato reintrodotta nel cosmide pLAF-*mtnp* e quindi è stato mobilizzato *in trans* nel ceppo wild type. Il frammento genico, sebbene rappresentasse la quasi totalità del gene codificante per una purina fosforilasi, non ha riprodotto un fenotipo simile a quello esibito dal cosmide pLAF RH1500. Tale dato potrebbe essere dovuto al fatto che il gene introdotto *in trans* non fosse integro pertanto può essere utile clonare entrambi i geni mediante PCR. Trasferirli distintamente in vettori specifici per le pseudomonadi fluorescenti e studiare la propria influenza sulla produzione di fenazine.

Nella regione di 3000 paia di basi clonata nel cosmide pLAF RH3000 è stato identificato un gene codificante per il fattore trascrizionale PsrA, identificato da Kojic e Venturi *et al.*, (2001). Tale regolatore genico è coinvolto nella regolazione della trascrizione del gene *rpoS*, codificante per il fattore sigma 38 o altrimenti detto sigma S responsabile della trascrizione di tutti i geni caratterizzanti la fase stazionaria. Sempre Kojic *et al.*, nel 2002 hanno dimostrato che PsrA si va a legare direttamente al promotore del gene *rpoS* ad una sequenza palindromica denominata per tale motivo *psrA box*. In *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 è stato dimostrato che tale fattore trascrizionale è collegato alla produzione del composto fenazinico PCN (Fenazina 1- carboxammide).

Chin-A Woeng *et al.*, 2005 difatti hanno dimostrato che la distruzione del gene *psrA* induce un incremento nella produzione delle fenazine. In più è stato verificato che il ceppo PCL1391 mancante di *psrA* è in grado di produrre fenazine anche in assenza del fattore trascrizionale PhzR, sebbene nel ceppo wild type la presenza di PhzR sia essenziale per la produzione di PCN. Tale dato riconduce a dati precedentemente ottenuti da Whistler e Pierson, 2003 nello studio condotto sulla proteina RpeA. Il ceppo *P. aureofaciens* 30-84 mancante di un fattore RpeA funzionale è capace di produrre fenazine anche laddove venisse distrutto il gene codificante per PhzR, lasciando ipotizzare che *psrA* e *rpeA* appartengono a sistemi di controllo delle fenazine che esulano dal sistema del quorum sensing.

Durante il nostro lavoro il gene *psrA* di *Pseudomonas aureofaciens* è stato identificato e clonato in cosmidi specifici per le pseudomonadi. La introduzione di copie multiple di tale gene *in trans* nel ceppo wild type ha comportato la totale riduzione della produzione delle fenazine mentre la introduzione del cosmide pLAF-*psrA*, quando presente *in trans* nel ceppo over produttore di fenazine *P. aureofaciens* 30-84 RpeA, ha determinato un ulteriore incremento nella produzione di fenazine. Tale risultato lascia ipotizzare che il fattore PsrA necessita dell'attività di RpeA per poter espletare il proprio controllo negativo sulla biosintesi delle fenazine.

Il ceppo wild type con copie multiple di pLAF-*psrA in trans* è stato saggiato anche per altri metaboliti secondari quali l'acido cianidrico e le proteasi. Il suddetto ceppo era capace di produrre entrambi i metaboliti secondari su menzionati e ciò ha portato ad ipotizzare che il fattore PsrA potesse essere responsabile dell'attivazione di fattori legati alla produzione di altri metaboliti secondari come ad esempio l'acido cianidrico. Nel ceppo 30-84 a valle del gene *rpoS* è stato identificato un gene

codificante per la molecola di RNA non codificante *rsmZ* che nel ceppo di biocontrollo *Pseudomonas fluorescens* CHA0 è legato alla regolazione dell'espressione postrascrizionale dell'operone *hcnAB*, responsabile della biosintesi dell'acido cianidrico.

A tale proposito è stata esaminata la regione a monte del gene codificante per *rsmZ* ed è stata identificata una regione riconducibile ad un *psrA* box. È stato quindi studiato il ruolo di *psrA* sulla espressione del suddetto RNA regolatore. Un ceppo reporter *P. aureofaciens* 30-84 ICE (*phzB::inaZ*) è stato trasformato con il costrutto pKT2 *PrsmZ-lacZ*, in cui il promotore di *rsmZ* è stato clonato a monte del gene reporter *lacZ* mancante per l'appunto di un promotore. Un incremento dell'attività galattosidasi è stato registrato quando il costrutto pLAF-*psrA* è stato mobilizzato nel suddetto ceppo attestando la capacità del fattore *PsrA* di attivare il promotore di *rsmZ*.

I due vettori elencati precedentemente sono stati mobilizzati anche nel ceppo *P. aureofaciens* 30-84 W, ceppo mancante di un fattore *GacA* funzionale. In *Pseudomonas fluorescens* CHA0 è stato dimostrato che *rsmZ* è trascritto soltanto nel momento in cui il ceppo batterico presenta il sistema a due componenti *GacS/GacA* integro e funzionale (Haas e Heeb, 2001). *PsrA* non è in grado di attivare il promotore di *rsmZ* quando presente nel ceppo 30-84W, tale dato indica che il sistema *GacS/GacA* esplica la propria azione regolatoria sulla trascrizione di *rsmZ* mediante l'azione di *PsrA*. È stato notato che è possibile apprezzare una sensibile differenza nell'attività del gene GFP del vettore pKT2 *PrsmZ-lacZ* quando nel ceppo 30-84 W tale plasmide coabita con il cosmide pLAF-*psrA*. La maggiore emissione di luminescenza è un dato interessante data la mancanza di una differenza sostanziale nell'attività galattosidasi.

Dato che *PsrA* controlla la trascrizione di *rsmZ* e *RpoS*, e siccome *rsmZ* è implicato nel controllo postrascrizionale di *RpoS*, è ipotizzabile che il contenuto del trascritto di *rpoS* subisca un incremento nel ceppo *P. aureofaciens* 30-84 quando presenta extra copie di pLAF-*psrA* tale da inibire la produzione di fenazine determinando la trascrizione di geni collegati alla fase stazionaria. È ipotizzabile tra l'altro anche un controllo diretto di *PsrA* sul fattore *PhzR*, il tutto mediato dal sistema a due componenti di cui fa parte *RpeA*.

Il legame di *PsrA* con i fattori *GacS/GacA*, *RpeA*, *RpoS* e *rsmZ* tutti legati alla produzione di fenazine, indica la necessità di analizzare i meccanismi molecolari

che sottendono alla interazione dei diversi fattori tra di loro. Ciò consentirà di chiarire ulteriormente il processo di biosintesi delle fenazine e quindi poter elaborare nuove strategie che possano essere utilizzate per migliorare la “fitness” dell’antagonista nell’ambiente e quindi la sua efficacia nel controllo di patogeni vegetali.

Bibliografia

Abken H.J., Tietze M., Brodersen J., Baumer S., Beyfuss U., Deppenmeier U., **1998** “Isolation and Characterization of Methanophenazine and Function of Phenazines in Membrane-Bound Electron Transport of *Methanosarcina mazei* Go1”. *Journal of Bacteriology* 180:2027-2032

Atwell G.J., Rewcastle G.W., Baguley B.C., Denny W.A, **1987** “Potential antitumor agents. 50. *In vivo* solid tumor activity of derivatives of *N*-[2-(dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide” *Journal of Medicinal Chemistry* 30: 664-669

Audenaert K, Pattery T, Cornelis P,Höfte M, **2002** “Induction of systemic resistance of *Botrytis cinerea* tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: Role of salicylic acid, pyochelin and pyocyanin” *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 15:1147-1156

Baron F.S., Terranova G., Rowe J.J., **1989** “Molecular mechanism of the antimicrobial action of pyocyanin” *Current Microbiology* 18:223-230

Beyfuss U., Tietze M., Baumer S., Deppenmeier U., 2000 “Methanophenazine: Structure, Total Synthesis, and Function of a New Cofactor from Methanogenic”*Angewandte Chemie International Edition* 39:2470-2472

Chancey S.T., Wood D.W., and Pierson L.S. III. **1999**. “Two-component transcriptional regulation of N-Acyl-homoseryne lactone production in *Pseudomonas aureofaciens*” *Applied Environmental Microbiology*. 65:2294-2299.

Chang, M., Essar D.W., and Crawford I. P., **1990**. Diverse regulation of the tryptophan genes in fluorescent pseudomonads, p. 292-302. *In* S. Silver, *et al.*

(ed.), ***Pseudomonas***: biotransformations, pathogenesis, and evolving biotechnology. ASM Press, Washington, D.C.

Chet I, **1987** “*Trichoderma*- Application, mode of action , and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi” Innovative approaches to plant disease control, 147-160

Chin-A-Woeng T.F.C, Bloemberg G.V, van der Bij A .J, van der Drift K.M.G.M., Schripsema J, Kroon B, Scheffer R.J, Keel C, Bakker P.A.H.M, Tichy H.V, de Bruijn F.J, Thomas-oates J.E, Lugtenberg B.J.J, **1998** “Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL 1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*” Molecular Plant-Microbe Interaction, 11:1069-1077

Chin-A-Woeng T.F.C, Bloemberg G.V, Lugtenberg B.J.J, **2003** “Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria” New Phytologist, 157:503-523

Corbell N, Loper J.E, **1995** “A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5” Journal of Bacteriology, 177: 6230-6236

Chin-A-Woeng T. F. C., van den Broek D., Lugtenberg B.J.J., and Bloemberg G.V., **2005** “The *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 Sigma Regulator *psrA* Represses the Production of the Antifungal Metabolite Phenazine-1-Carboxamide” Molecular Plant Microbe Interaction 18:244-253

Cornelis P, Matthijs S, **2002** “Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines” Environmental Microbiology, 4:787-798

Delaney S.M., Mavrodi D.V., Bonsall R.F, Thomashow L.S, 2001 “*phzO*, a Gene for Biosynthesis of 2-Hydroxylated Phenazine Compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84” Journal of Bacteriology 183: 318-327

Faraldo-Gómez J. D, Sansom M.S.P, **2003** “Acquisitino of siderophores in Gram-negative bacteria” *Molecular Cell Biology*, 4:105-116

Feliay et al. **1987**. *Gene* 52:147-154

Ferrari M, Marcon E, Menta A, **2000** “Lotta biologica” Ed agricole, 42-43

FlaishmanM, Eyal Z,Voisard C, Haas D, **1990** “Suppression of *Septoria tritici* by phenazine- or siderophore-deficient mutants of *Pseudomonas*” *Current microbiology*, 20:121-124

Folders J, Algra J, Roelofs M.S, van Loon L.C, tomassen J, Bitter W, **2001** “Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* chitinase, a gradually secreted protein” *Journal of Bacteriology*, 183:7044-7052

Fuqua W.C, Winans S.C, Greenberg E.P, **1994** “Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators” *Journal of Bacteriology*, 176:269-275

Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP., **1996**“Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators” *Annual Review Microbiology* 50:727-751

Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negretto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmanan H, Ryals J, **1993** “Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance” *Science*, 271:754-756

Gallagher S.R., **1992** “Gus protocols: Using the Gus gene as a reporter of gene expression”. Academic Press, Inc., San Diego

Haynes W.C., Stodola F.H., Locke J.M., Pridham T.G. Conway H.F., Sohns V.E., and Jackson R.W., **1956** “*Pseudomonas aureofaciens* Kluver and phenazine α -carboxylic acid, its characteristic pigment” *Journal of Bacteriology* 72(3):412-7.

Hassan H. M., Fridovich I., **1980** “Mechanism of the antibiotic action of pyocyanine” *Journal of Bacteriology* 141:156-163

Heeb S., and Haas D., **2001** “Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant system in plant-associated and other gram negative bacteria” *Molecular Plant-Microbe Interaction* 14: 1351-1363

Hollstein U., Van Gemert R.J.J., **1971** “Interaction of phenazines with polydeoxyribonucleotides” *Biochemistry* 10: 497-504

Homma Y, Sato Z, Hirayama F, Konno K, Shirahama H, Suzui T, **1989** “Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soilborne pathogens” *Soil biology biochemistry*, 21:723-728

Johansen K, Andersen S, Jacobsen C.S, **1996** “Phenotypic and genotypic characterization of phenantrene-degrading fluorescent *Pseudomonas* biovars” *Applied and Environmental Microbiology*, 3818-3825

Kell C, Wirthner P, Oberhansli T, Voisard C, Haas D, Dèfago G, **1990** “Pseudomonads as antagonists of plant pathogens in the rhizosphere: role of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol in the suppression of black root of tobacco” *Symbiosis*, 9:327-341

Kerr J.R., **2000** “Phenazine pigments: antibiotics and virulence factors” *Infectious Disease Reviews* 2. 184-194

Kojic M., and Venturi V., **2001** “Regulation of *rpoS* gene expression in *Pseudomonas*: involvement of a TetR family regulator” *Journal of Bacteriology* 183:3712-3720

Kojic M., Aguilar C., and Venturi V., **2002** “TetR family member *psrA* directly binds *Pseudomonas rpoS* and *psrA* promoters” *Journal of Bacteriology* 184:2324-2330

Krieg N.R, Holt J.G, **1978** “Bergey’s manual of determinative of bacteriology“
vol.I e vol.II

Laguerre G, Rigottier-Gois L, Lemanceau P, **1994** “Fluorescent pseudomonads species categorized by using polymerase chain reaction (PCR)/ restriction fragment analysis of 16S rDNA” *Molecular Ecology*, 3:479-487

Maniatis T., Fritsch E. F., and Sambrook J. **1982** “Molecular cloning: a laboratory manual” Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y

Mavrodi, D.V., Ksenzenko V.N., Bonsall R.F., Cook R.J., Boronin A.M., and Thomashow L.S., **1998**. “A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79”. *Journal of Bacteriology* 180:2541-2548

Mazzola M., Cook R.J., Thomashow L.S, Weller D.M., and Pierson L.S., III **1992** “Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats” *Applied and Environmental Microbiology* 58(8): 2616-2624

Metcalf W.W., Wanner B.L. **1993** “Construction of new beta-glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement” *Gene*. 129:17-25.

Miller, J. **1972** “Experiments in molecular genetics”. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

Miller W.G., Leveau J.H.J, and Lindow S.E. **2000**. “Improved *gfp* and *inaZ* broad –host –range promoter-probe vectors”. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 13:1243-1250

Palleroni N.J, **1992** “Present situation of the taxonomy of aerobic pseudomonads” *Pseudomonas Molecular biology and biotechnology*, Galli, 105-115

Palleroni N.J, **2003** “Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view” Microbiology, 149:1-7

Papavizas G.C, **1985** “*Thricoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol” Annuary Review Phytopathology, 23:23-54

Park J. ,**2001** “Identification of a Dedicated Recycling Pathway for Anhydro-*N*-Acetylmuramic Acid and *N*-Acetylglucosamine Derived from *Escherichia coli* Cell Wall Murein” Journal of Bacteriology 183 (13) 3842-3847

Pierson L.S. III, Thomashow L.S, **1992** “Cloning and heterologus expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-84” Molecular Plant-Microbe Interaction, 5:330-339

Pierson L.S. III, Kepenne V.D., e. Wood D.W **1994** ”Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density”. Journal of Bacteriology. 176: 3966-3974.

Pierson L.S. III, Gaffney T, Lam S, Gong F, **1995** “Molecular analysis of genes encoding phenazine biosynthesis in the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84” FEMS Microbiological Letters, 134:299-307

Pierson L.S. III, Pierson E.A, **1996** “Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*: role in rizosphere ecology and pathogen suppression” FEMS Microbiological Letters, 181:1203-1210

Pieterse C.M.J, van Pelt J.A, van Wees S.C.M, Ton J, Leon-Kloosterziel K.M, Keurentjes J.J.B, Verhangen B.W.M, van Knoester M, Bakker P.A.H.M, van Loon L.C, **2001** “Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signalling and expression” European journal of Plant Pathology, 107:51-61

Prescott, Harley, Klein, **2000** “Microbiologia” Zanichelli, 471-494

Quigley N.B., and Reeves P.R. **1987**. "Chloramphenicol resistance cloning vector based on pUC9". Plasmid. 17:54-57.

Raijmakers J.M, Weller D.M, Thomashow L.S, **1997** "Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments" Applied and Environmental Microbiology, 63:881-887

Sand D.C, Rovira A.D, **1971** "*Pseudomonas fluorescent* biotype G, the dominant fluorescent pseudomonad in South Australian soils and weath rhizosphere" Journal of Applied Bacteriology, 34:261-275

Scortichini M, **1995** "Malattie batteriche delle colture agrarie" Ed agricole

Sekowska A., Denervaud V., Ashida H., Michoud K., Haas D., Yokota A., Danchin A., **2004** "Bacterial variations on the methionine salvage pathway". BMC Microbiology 4: 1-17

Sorensen R.U., Joseph F.J., **1993** "Pseudomonas aeruginosa as an Opportunistic Pathogen" Campa M., Bendinelli M., Friedman H., Eds.: Plenum Press: New York. Pag 43

Spiers A.J, Buckling A, Rainey P.B, **2000** "The causes of *Pseudomonas* diversity" microbiology, 146:2345-2350

Stanier R.Y, Ingraham J.L, Wheelis M.L, Painter P.R, **1998** "Il mondo dei microrganismi" Zanichelli

Staskawowicz B., Dahlbreck D., Keen N., and Napoli C. **1987** "Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*" Journal of Bacteriology. 169:5789-5794

Suslow T.V, Schroth M.N, Isake M, **1982** "Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining" The American Phytopathological Society, 72:356-358

Thomashow L.S, Weller D.M, **1988** “Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var.*tritici*” Journal of Bacteriology, 170:3499-3508

Turner J.M., Messenger A.J., **1986** “Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production” Advances in Microbial Physiology 27: 211-275

Visca V, Colorii G, Serino L, Versili D, Orsi N, Chiancone E, **1992** “Metal regulation of siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore-metal complexes” Applied and Environmental Microbiology, 58:2886-2893

Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., and Lane D. J., **1991** “16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study” Journal of Bacteriology 173(2):697-703.

Whistler C. A., and Pierson L. S. III, **2003** “Repression of phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens* strain 30-84 by RpeA” Journal of Bacteriology, 185 (13): 3718-3725.

Widmer F., Seidler R.J., Gillevet P.M., Watrud L.S, and Di Giovanni G.D., **1998** “A Highly Selective PCR Protocol for Detecting 16S rRNA Genes of the Genus *Pseudomonas* (Sensu Stricto) in Environmental Samples” Applied and Environmental Microbiology 64 (7): 2545-2553

Wood D.W., and Pierson L.S.III. **1996** ”The *phzI* gene of *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is responsible for the production of a diffusible signal required for phenazine antibiotic production”. Gene 168:49-53

Wood D.W., Gong F., Daykin M.M., Williams P., and Pierson L.S. III.**1997**. “*N*-Acyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere”. Journal of Bacteriology.179: 7603-7670.

Zhang Z., and Pierson L.S. III **2001** “A second quorum sensing system regulates cell surface properties but no phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*”. Applied Environmental Microbiology. 67:4305-4315.